

CAROLINA SMANHOTTO SCHUCHOVSKI AUGUSTO

## **MICROPROPAGAÇÃO DA AMOREIRA-PRETA CV. BRAZOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

CURITIBA

2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL

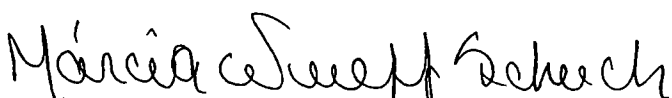
**PARECER**

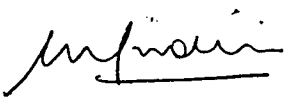
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **CAROLINA SMANHOTTO SCHUCHOVSKI AUGUSTO**, sob o título "**MICROPROPAGAÇÃO DA AMOREIRA-PRETA CV. BRAZOS**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

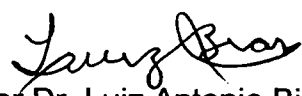
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 14 de Dezembro de 2001.

  
Dr. Gerson Renan de Luces Fortes  
Primeiro Examinador

  
Professora Dra. Marcia W. Schuch  
Segunda Examinadora

  
Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin  
Terceira Examinadora

  
Professor Dr. Luiz Antonio Biasi  
Presidente da Banca e Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Para se chegar ao final de uma dissertação de mestrado é necessário muito esforço e dedicação, mas, além disso, é fundamental e imprescindível a participação e contribuição de diversas pessoas.

Agradeço ao meu orientador, o professor Luiz Antonio Biasi, pela competente e precisa orientação, pela grande participação e atuação direta em todas as etapas do trabalho, sempre conduzindo com muita objetividade, dedicação e otimismo para que o trabalho saísse do planejamento para se tornar realidade.

Agradeço, especialmente, ao meu marido Paulo, por ser tão maravilhoso e por me incentivar de maneira decisiva a iniciar o mestrado. Pela fundamental participação desde o início dos trabalhos, com muitos conselhos e dedicação, compartilhando cada momento de cada uma das etapas do curso.

Agradeço aos meus pais Rita e José, por me ensinarem muito da vida, pelos exemplos, pela participação, pelo enorme incentivo e apoio e pelo profundo entusiasmo em conhecer e participar dos trabalhos.

Agradeço às minhas irmãs Mariana e Angela, pela grande amizade, sugestões, críticas, apoio e participação.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Curso de Mestrado em Agronomia, pela oportunidade e pela qualidade de ensino. Aos professores, pela dedicação e pelo incentivo ao pensamento crítico e aos colegas do mestrado, em especial à Claudine, pela troca de idéias, amizade e incentivo.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que participaram deste trabalho e que me incentivaram a seguir o caminho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA AMOREIRA.....	6
2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE AMOREIRA.....	7
2.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> .....	9
2.4 PROCESSOS DE MICROPROPAGAÇÃO UTILIZADOS EM ESPÉCIES DE <i>Rubus</i> .....	12
2.5 FASE DE CULTIVO INICIAL.....	16
2.5.1 Fontes dos explantes.....	16
2.5.2 Tipos de explantes .....	18
2.5.3 Assepsia .....	20
2.5.4 Antioxidante.....	21
2.5.5 Meio de cultura.....	22
2.6 FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	29
2.6.1 Meio de cultura.....	30
2.7 FASE DE ALONGAMENTO .....	32
2.8 FASE DE ENRAIZAMENTO .....	33
2.9 FASE DE ACLIMATAÇÃO.....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 LOCAL E PERÍODO.....	41
3.2 FONTE E TIPOS DE EXPLANTES .....	41
3.3 MEIO DE CULTURA E FRASCOS DE CULTIVO .....	43

3.4	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	44
3.5	EXPERIMENTOS NA FASE DE CULTIVO INICIAL .....	44
3.5.1	Experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais.....	44
3.5.2	Experimento de controle da oxidação no cultivo de meristemas.....	45
3.6	EXPERIMENTOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	46
3.6.1	Experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas.....	46
3.6.2	Experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura.....	48
3.7	EXPERIMENTOS NA FASE DE ENRAIZAMENTO .....	50
3.7.1	Experimento de enraizamento <i>in vitro</i> com ou sem AIB .....	50
3.7.2	Experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com diferentes tipos e concentrações de citocininas.....	51
3.8	EXPERIMENTO NA FASE DE ACLIMATAÇÃO.....	52
3.8.1	Experimento de aclimação após enraizamento <i>in vitro</i> .....	52
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
3.10	VISÃO GERAL DA SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS .....	54
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
4.1	EXPERIMENTOS NA FASE DE CULTIVO INICIAL .....	56
4.1.1	Experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais.....	56
4.1.2	Experimento de controle da oxidação no cultivo de meristemas.....	58
4.2	EXPERIMENTOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	60
4.2.1	Experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas.....	60
4.2.2	Experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura.....	76
4.3	EXPERIMENTOS NA FASE DE ENRAIZAMENTO .....	84
4.3.1	Experimento de enraizamento <i>in vitro</i> com ou sem AIB .....	84

4.3.2	Experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas .....	87
4.4	EXPERIMENTO NA FASE DE ACLIMATAÇÃO .....	90
4.4.1	Experimento de aclimação após enraizamento <i>in vitro</i> .....	90
4.5	PROTOCOLO PARA MICROPROPAGAÇÃO DE AMOREIRA-PRETA .....	93
5	CONCLUSÕES .....	95
6	SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS .....	96
	REFERÊNCIAS .....	98
	ANEXOS .....	105
	LISTA DE ANEXOS .....	106

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Concentrações dos sais minerais dos meios de cultura utilizados no experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	49
TABELA 2 -	Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) sobre a taxa de contaminação de segmentos nodais de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	56
TABELA 3 -	Efeito do PVP K 25 no controle da oxidação de ápices meristemáticos no cultivo inicial de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	59
TABELA 4 -	Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no primeiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	61
TABELA 5 -	Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no segundo subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	64
TABELA 6 -	Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no terceiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	66
TABELA 7 -	Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no quarto subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	69

TABELA 8 -	Projeção do número de mudas que poderiam ser obtidas após 36 semanas de micropropagação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos, com a taxa de multiplicação de 4,4; 6,1 e 7,9 brotos por micro-estaca obtidas no 1º, 2º e 3º subcultivos, respectivamente, e mantendo a taxa de 7,9 brotos por micro-estaca a partir do terceiro cultivo.....	76
TABELA 9 -	Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no primeiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	77
TABELA 10 -	Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no segundo subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	79
TABELA 11 -	Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no terceiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos .....	81
TABELA 12 -	Efeito da imersão ou não em solução 1 mM o AIB na porcentagem de plântulas enraizadas, número de raízes por plântula, comprimento das raízes, altura das plântulas e número de folhas por plântula no enraizamento <i>in vitro</i> de micro-estacas de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos. ....	84
TABELA 13 -	Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas da fase de multiplicação na primeira avaliação da porcentagem de plântulas que sobreviveram, porcentagem de plântulas enraizadas, altura das plântulas e o número de folhas por plântula no enraizamento <i>ex vitro</i> da amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	87



TABELA 14 - Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas da fase de multiplicação na segunda avaliação da porcentagem de mudas que sobreviveram, altura das mudas e número de folhas por muda no enraizamento <i>ex vitro</i> amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	89
TABELA 15 - Efeito da presença ou ausência de sacarose do meio de cultura de enraizamento <i>in vitro</i> na porcentagem de plântulas que sobreviveram, altura das plântulas e número de folhas por plântula no experimento de aclimação de plântulas de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	91
TABELA 16 - Efeito do método de aclimação na porcentagem de plântulas que sobreviveram, altura das plântulas e número de folhas por plântula no experimento de aclimação de plântulas de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	92

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos. <i>Em cima à esquerda:</i> plantas matrizes na casa de vegetação. <i>Em cima à direita:</i> segmento nodal. <i>Embaixo à esquerda:</i> subdivisão dos brotos desenvolvidos que podem ser individualizados em micro-estacas. <i>Embaixo à direita:</i> ápice meristemático.....	42
FIGURA 2 -	Experimentos realizados no trabalho de micropropagação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	55
FIGURA 3 -	Experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas mostrando o aspecto geral das brotações a partir da micro-estaca inicial. <i>Em cima:</i> primeiro subcultivo. <i>No centro:</i> segundo subcultivo. <i>Embaixo:</i> planta vitrificada (à esquerda) comparada a uma planta normal (à direita). ....	62
FIGURA 4 -	Experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas. <i>Em cima:</i> terceiro subcultivo. <i>Embaixo:</i> quarto subcultivo. ....	68
FIGURA 5 -	Comparação do número de brotos por micro-estaca em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas .....	73
FIGURA 6 -	Comparação da altura dos brotos em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas.....	74
FIGURA 7 -	Comparação do número de folhas por broto em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas .....	75

FIGURA 8 -	Experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura mostrando o aspecto geral das brotações a partir da micro-estaca inicial. <i>Em cima</i> : primeiro subcultivo. <i>No centro</i> : segundo subcultivo. <i>Embaixo</i> : terceiro subcultivo.....	78
FIGURA 9 -	Comparação do número de brotos por micro-estaca em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura.....	82
FIGURA 10 -	Comparação da altura dos brotos em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura .....	83
FIGURA 11 -	Comparação do número de folhas por broto em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura.....	83
FIGURA 12 -	Experimentos de enraizamento e aclimação com amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos. <i>Em cima à esquerda</i> : experimento de enraizamento <i>in vitro</i> mostrando plantas do tratamento sem imersão em AIB (em cima) e com imersão em AIB (embaixo). <i>Em cima à direita</i> : aspecto das raízes no vidro do experimento de enraizamento <i>in vitro</i> . <i>No centro à esquerda</i> : plântulas na bandeja de isopor sob nebulização intermitente do experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> . <i>No centro à direita</i> : mudas em sacos plásticos aclimatadas do experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> . <i>Embaixo à esquerda</i> : plântulas sob túnel plástico do experimento de aclimação. <i>Embaixo à direita</i> : plântulas sob nebulização intermitente do experimento de aclimação.....	86
FIGURA 13 -	Protocolo de micropropagação de amoreira-preta ( <i>Rubus</i> sp.) cv. Brazos.....	94

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Condições de temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa e tipo de lâmpadas utilizadas na sala de cultivo para a micropropagação de amoreira ( <i>Rubus</i> spp.).....	10
QUADRO 2 - Espécies, cultivares, processos, fontes e tipos de explantes e procedimentos de assepsia utilizados na micropropagação de amoreira ( <i>Rubus</i> spp.) .....	13
QUADRO 3 - Meios de cultura, reguladores de crescimento e outros aditivos utilizados na fase de cultivo inicial da micropropagação de amoreira ( <i>Rubus</i> spp.) .....	23
QUADRO 4 - Meios de cultura, reguladores de crescimento e outros aditivos utilizados na fase de multiplicação da micropropagação de amoreira ( <i>Rubus</i> spp.) .....	30
QUADRO 5 - Meios de cultura, substratos e reguladores de crescimento utilizados na fase de enraizamento da micropropagação de amoreira ( <i>Rubus</i> spp.) .....	34

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	-	marca registrada
µm	-	micrômetro(s)
µM	-	micromolar
µmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	-	micromol(es) por metro quadrado por segundo
2,4-D	-	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	-	isopenteniladenina
AG <sub>3</sub>	-	ácido giberélico (2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8metileno-gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona)
AIA	-	ácido 3-indolacético
AIB	-	ácido indolbutírico
ANA	-	ácido naftalenoacético
AND	-	meio de cultura de ANDERSON (1980)
atm	-	atmosfera(s) de pressão
BAP	-	6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina
CIN	-	cinetina (6-furfulrilaminopurina) ou N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6-amina)
CIP	-	fenótipo induzido pelo cultivo <i>in vitro</i>
cm	-	centímetro(s)
CO <sub>2</sub>	-	gás carbônico
CPPU	-	N-(2-cloro-4-piridil)-N-feniluréia
cv.	-	cultivar(es)
g	-	grama(s)
g.L <sup>-1</sup>	-	grama(s) por litro
HCl	-	ácido clorídrico
HgCl <sub>2</sub>	-	cloreto de mercúrio
kg	-	kilograma(s)
Klx	-	kilolux
L	-	litro(s)

m	-	metro(s)
M	-	molar
m <sup>2</sup>	-	metro(s) quadrado
mg	-	miligrama(s)
mg.L <sup>-1</sup>	-	miligrama(s) por litro
min	-	minuto(s)
mL	-	mililitro(s)
mm	-	milímetro(s)
mM	-	milimolar
mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	-	milimol(es) por metro quadrado por segundo
mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	-	mol(es) por metro quadrado por segundo
MS	-	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)
MS/2	-	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962) com a concentração de sais reduzida à metade
NaOCl	-	hipoclorito de sódio
NaOH	-	hidróxido de sódio
°C	-	grau(s) Celsius
p/v	-	relação peso/volume
PVP	-	polivinilpirrolidona
QL	-	meio de cultura de QUOIRIN e LEPOIVRE (1977)
s	-	segundo(s)
t	-	tonelada(s)
TDZ	-	tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiadizol-5-il) uréia)
v/v	-	relação volume/volume
W	-	watts
WPM	-	meio de cultura Woody Plant Medium de LLOYD e McCOWN (1986)
ZEA	-	zeatina (N <sup>6</sup> -(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina)

## RESUMO

A amoreira-preta (*Rubus* sp.) é uma espécie propagada vegetativamente, principalmente pela estaquia de ramos e raízes. No entanto, há muitos problemas fitossanitários decorrentes desta técnica. Este trabalho objetiva definir um protocolo eficiente para a micropropagação de amoreira-preta, oferecendo uma alternativa aos métodos de propagação tradicionalmente utilizados no Brasil. Utilizaram-se plantas matrizes da cultivar Brazos, mantidas em casa de vegetação. Realizou-se um experimento de assepsia de segmentos nodais, testando a imersão em hipoclorito de sódio (0,5%) por 0, 10, 20 e 30 minutos. Na fase de cultivo inicial testaram-se concentrações (0; 1 e 2 g.L<sup>-1</sup>) do antioxidante PVP K 25 com ápices meristemáticos. Na fase de multiplicação, testaram-se as citocininas BAP, cinetina, zeatina, 2iP e tidiazuron nas concentrações de 5 e 10 µM, mais a testemunha. Este experimento foi repetido por mais três subcultivos. Outro experimento na fase de multiplicação foi realizado testando-se os meios de cultura MS, MS/2, AND, QL e WPM. Este experimento foi repetido por mais dois subcultivos. Na fase seguinte realizou-se um experimento de enraizamento *in vitro* com ou sem imersão em solução 1 mM de AIB. Outro experimento de enraizamento foi realizado em casa de vegetação com nebulização intermitente, com as plantas provenientes dos tratamentos do experimento de multiplicação com diferentes citocininas. Na fase final testou-se a influência da sacarose no meio de cultura de enraizamento na aclimação em casa de vegetação em túnel plástico ou sob nebulização intermitente. Os resultados foram os seguintes. A contaminação dos explantes foi reduzida com a utilização de NaOCl em todos os tempos de imersão. O PVP, nas duas concentrações testadas, reduziu a oxidação. No experimento de multiplicação com citocininas, o tidiazuron não se mostrou viável devido à má formação dos brotos e crescimento exagerado de calos. As mais altas taxas de multiplicação foram obtidas com BAP, nas duas concentrações testadas, obtendo-se 4,4; 6,1; 7,9 e 2,6 brotos por micro-estaca para a concentração de 5 µM e 4,3; 4,7; 4,8 e 2,1 para 10 µM, na sequência dos quatro subcultivos. No experimento de multiplicação com meios de cultura, nos três subcultivos houve uma tendência de maior taxa de multiplicação com o meio MS, apresentando 3,9; 4,3 e 2,5 brotos por micro-estaca para a primeira, segunda e terceira repicagens. No experimento de enraizamento *in vitro*, obteve-se mais de 95% de enraizamento nos dois tratamentos. No enraizamento *ex vitro*, as taxas de enraizamento e sobrevivência foram de 100%. No experimento de aclimação, em todos os tratamentos houve 100% de sobrevivência. Pode-se concluir que um protocolo eficiente para a micropropagação de amoreira-preta é a assepsia com imersão por 10 minutos em NaOCl a 0,5%, com adição de 1 g.L<sup>-1</sup> de PVP na fase inicial, multiplicação no meio MS com 5 µM de BAP e enraizamento *in vitro* sem AIB e sem a adição de sacarose ao meio de cultura, com posterior aclimação em túnel plástico ou o enraizamento *ex vitro* e aclimação em casa de vegetação com nebulização intermitente.

Palavras-chave: amora-preta, *Rubus* sp., micropropagação, cultura de tecidos, reguladores de crescimento.

## ABSTRACT

Blackberry (*Rubus* sp.) is a species vegetatively propagated, specially by root and herbaceous cuttings. However, there are many phytosanitary problems derived from these propagation methods. The aim of this work was to achieve an efficient blackberry micropropagation protocol, offering an alternative to the traditional propagation methods used in Brazil. Mother plants from Brazos cultivar were kept into a greenhouse. Disinfestation experiments with nodal stems were done to test the immersion in a 0,5% solution of sodium hypochlorite for 0, 10, 20 and 30 minutes. In the establishment stage, several concentrations of the antioxidant PVP K 25 (0, 1 and 2 g.L<sup>-1</sup>) were tested in the meristem culture. In the multiplication stage, different cytokinins (BAP, kinetin, zeatin, 2iP and thidiazuron) were tested in two concentrations (5 and 10 µM) plus growth regulator free medium. This experiment was repeated for more three subcultures. Another experiment during the multiplication stage was done to test different culture media with the treatments as follows: MS, MS/2, AND, QL and WPM. This experiment was repeated for more two subcultures. In the following stage, an *in vitro* rooting experiment was done with or without immersion in a 1 mM solution of indolbutiric acid. Another rooting experiment was done in a greenhouse with intermittent mist with the plants proceeding from the same treatments from the multiplication experiment with different cytokinins. In the final stage the influence of sucrose from the rooting media was tested in the acclimatization in greenhouse under plastic tunnel or under intermittent mist. The results found were that the explant contamination was reduced with the use of NaOCl in all the immersion time. The PVP, in the two tested concentrations, reduced oxidation. In the multiplication experiment with cytokinins, thidiazuron was not viable because of the shoot malformation and great callus formation. The highest multiplication rates were obtained with BAP in the two tested concentrations, obtaining 4.4, 6.1, 7.9 and 2.6 shoots per explant in the 5 µM concentration and 4.3, 4.7, 4.8 and 2.1 shoots per explant in the 10 µM concentration, in the four subcultures. In the multiplication experiment with culture media, in the three subcultures, there was a tendency of higher multiplication in MS media, reaching 3.9, 4.3 and 2.5 shoots per explant in the first, second and third subculture. The percentage of rooting was higher than 95% in both treatments of *in vitro* rooting. For the *ex vitro* rooting experiment, the rooting and survival rates were 100%. In the acclimatization experiment all the treatments showed 100% of survival. It can be concluded that an efficient protocol for blackberry micropropagation is: disinfestation for 10 minutes immersion in sodium hypochlorite (0.5%), adding 1 g.L<sup>-1</sup> of PVP in the initial stage, multiplication in MS media supplemented with BAP (5 µM) and *in vitro* rooting without indolbutiric acid and without sucrose in the culture media with acclimatization under plastic tunnel or *ex vitro* rooting and acclimatization under intermittent mist in a greenhouse.

Key-words: blackberry, *Rubus* sp., micropropagation, tissue culture, growth regulators.



## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho trata das técnicas de micropropagação de amoreira-preta. A micropropagação é um método de propagação vegetativa realizado *in vitro* (HARTMANN et al., 1997) e é uma das aplicações mais práticas da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A amoreira-preta vem sendo cultivada desde o século passado nos Estados Unidos, e no Brasil o seu cultivo teve início apenas em 1972, quando as primeiras mudas procedentes da Universidade de Arkansas foram introduzidas pelo Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) da Embrapa (Pelotas, Rio Grande do Sul). As cultivares trazidas adaptaram-se muito bem na região do Rio Grande do Sul, e seu cultivo foi expandido aos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (RASEIRA, SANTOS e MADAIL, 1996). O maior produtor nacional é o estado do Rio Grande do Sul, com a produção aproximada de 700 t por ano (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2001). A amoreira-preta representa uma opção de grande interesse aos fruticultores, pelo mercado existente (PERUZZO, DAL BÓ e PICCOLI, 1995) e por representar uma alternativa viável de diversificação às propriedades (ANTUNES et al., 2000).

Entre as cultivares norte-americanas está a Brazos, que é a cultivar estudada no presente trabalho. Ela foi escolhida por ser muito utilizada na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Os motivos apresentados pelos produtores são a alta produtividade, a resistência a doenças, o vigor e a produção de frutos com boa aceitação no mercado. Os frutos produzidos são de tamanho grande (6 a 7 g) de consistência firme. A planta é semi-ereta e pode ser conduzida com ou sem o auxílio de espaldeira. O florescimento dessa cultivar se dá no mês de setembro (RASEIRA, SANTOS e MADAIL, 1996) e a produção dos frutos ocorre nos meses de novembro,

dezembro e janeiro (PERUZZO, DAL BÓ e PICCOLI, 1995). Segundo ANTUNES et al. (2000), a cultivar Brazos produz mais frutos, comparativamente a outras cultivares como Comanche, Guarani, Tupy, Cherokee, Caingangue ou Ébano, alcançando produtividades de 5,3 kg por planta ou 25,2 t por ha.

O cultivo de amoreira é realizado com a finalidade de produção de frutos, que podem ser consumidos ao natural ou utilizados na fabricação de geleias, doces, sucos, conservas, fermentos, polpas, sorvetes, iogurtes, tortas, bolos, corantes, entre outros.

Há também algumas descobertas com relação à utilidade medicinal da amoreira-preta, como a anticancerígena, pela ação do ácido elágico, e o combate à osteoporose, devido à alta concentração de cálcio dos frutos (46 mg em 100 g de fruto). A amoreira-preta é também utilizada como tônico muscular devido à alta concentração de potássio dos frutos (245 mg em 100 g de fruto) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2001).

O método de propagação tradicionalmente utilizado na amoreira-preta consiste da estaquia de raízes e de ramos e da subdivisão de touceiras de um ano de idade. Isso explica a grande disseminação de doenças e pragas na amoreira. Os danos sanitários mais sérios em *Rubus* são causados por vírus. As espécies de amoreira são altamente suscetíveis a infecções de vírus específicos de *Rubus* e também de outras espécies herbáceas e lenhosas (SOBCZYKIEWICZ, 1992).

Uma das maneiras para se evitar a transmissão de viroses e outras doenças na propagação de plantas de amoreira é a utilização de técnicas de micropropagação a partir de meristemas, tanto para a formação de plantas matrizes sadias, quanto para a formação de mudas.

Além do aspecto fitossanitário, a micropropagação tem-se mostrado de grande importância na propagação de plantas, em diversos aspectos. Através desse método de propagação, pode-se obter um grande número de plantas em espaço e tempo reduzidos. Esse aspecto se torna de fundamental importância quando da necessidade de rápida propagação de muitas mudas de novas cultivares.

Por ser um método de propagação vegetativa, a micropropagação pode produzir mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz, permitindo

a clonagem de genótipos selecionados, de alta qualidade genética. Além disso, todas as mudas produzidas são uniformes em todas as suas características, o que facilita o manuseio, o transporte e os tratamentos culturais.

Outro aspecto dessa técnica é a possibilidade de iniciar-se com pequena quantidade de material vegetal de plantas matrizes para a propagação e, rapidamente, produzir-se uma grande quantidade de mudas. Isso é muito importante, especificamente na amoreira, pois o método tradicional de propagação depende do número de ramos e raízes, que além de não serem muitos, nem sempre estão disponíveis em quantidade satisfatória em função do padrão de crescimento sazonal da espécie.

Outra vantagem da micropropagação é a de que toda a produção pode ser planejada e conduzida de acordo com a demanda de mudas, pois ela é realizada em ambiente de laboratórios e em casas de vegetação, podendo-se produzir durante todo o ano e, havendo necessidade, as mudas podem ser conservadas em câmaras frias. Além disso, as mudas micropropagadas são mais facilmente manuseadas e comercializadas em embalagens de pequeno volume e peso com pouco substrato.

O estudo da micropropagação em amoreira-preta é de grande relevância, pois há poucas pesquisas aprofundadas neste tema no Brasil e a amoreira-preta é uma espécie importante, principalmente para os estados produtores no país, tais como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais. Sobretudo, são quase inexistentes os trabalhos de micropropagação específicos para a cultivar Brazos, e, segundo McNICOL e GRAHAM (1990); SOBCZYKIEWICZ (1992); GRAHAM, IASI e MILLAM (1997); MILLÁN-MENDOZA (1998) e MOKHAMMED e BUTENKO (1998), a regeneração é bastante dependente do genótipo de *Rubus* utilizado. Segundo esses autores, um método desenvolvido para uma cultivar pode apresentar resultados distintos em outras cultivares. Por isso é de grande importância o desenvolvimento de pesquisas específicas para a cultivar que se deseja micropropagar.

Tomando por base a literatura recente, que mostra que em diversos aspectos do processo de micropropagação da amoreira não há consenso nas técnicas utilizadas, a decisão de analisar esses aspectos ainda não bem definidos pode consolidar os

conhecimentos em relação às técnicas de micropropagação de amoreira-preta, auxiliando no desenvolvimento de protocolos mais específicos e mais eficientes, que podem representar uma alternativa aos métodos de propagação utilizados tradicionalmente. Pode-se, a partir daí, desenvolver sistemas comercialmente viáveis para a produção de mudas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos, com qualidade, em espaço físico e tempo reduzidos, com uma boa relação custo-benefício.

Além disso, as técnicas utilizadas e os resultados e discussão apresentados neste trabalho podem contribuir para a ampliação dos conhecimentos e técnicas de micropropagação para outras espécies de plantas.

Ainda, as técnicas de cultura de tecidos pesquisadas neste trabalho de micropropagação podem ser muito úteis para outras técnicas que requeiram processos bem definidos de regeneração de plantas, tais como o melhoramento genético de plantas, a produção de compostos naturais e de metabólitos secundários *in vitro* e a conservação de germoplasma *in vitro*, entre outros.

O objetivo geral da pesquisa é definir um protocolo eficiente para a micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Brazos.

Para alcançar o objetivo proposto, definiram-se alguns objetivos específicos:

- a) verificar qual o mais eficiente tempo de imersão em hipoclorito de sódio na desinfecção superficial de segmentos nodais de amoreira-preta;
- b) determinar a dose mais adequada do antioxidante PVP no cultivo inicial de ápices meristemáticos de amoreira-preta;
- c) determinar o mais eficiente regulador de crescimento do grupo das citocininas e a sua concentração para a fase de multiplicação de amoreira-preta;
- d) verificar o melhor meio de cultura para a fase de multiplicação;
- e) definir a necessidade ou não da imersão dos explantes em AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento *in vitro*;
- f) verificar se o enraizamento *ex vitro* e se a aclimação são influenciados pela origem dos explantes na fase de multiplicação, provenientes de meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento;

- g) determinar se a sacarose no meio de cultura na etapa de enraizamento *in vitro* interfere na fase de aclimação em casa de vegetação com nebulização e em túnel plástico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA AMOREIRA

A amoreira-preta pertence à família *Rosaceae* e ao gênero *Rubus*. Esse gênero é um dos mais diversificados e possui aproximadamente 740 espécies (DAUBENY, 1996). Ele compreende as diversas espécies de amoreiras-pretas, amoreiras-vermelhas e framboesas. As diferentes espécies deste gênero mostram-se de grande adaptação a variadas condições edafoclimáticas, sendo mais comuns nas regiões temperadas e frias.

A amoreira-preta produz frutos sobre ramos bianuais e a parte subterrânea do caule e a raiz são perenes. No entanto, a parte aérea das plantas se renova anualmente, pois a produção de frutos ocorre da seguinte maneira: as flores e os frutos se desenvolvem nos ramos do ano anterior e, ao mesmo tempo, novas hastes emergem e crescem. Ao final da colheita, os ramos que produziram morrem e as novas hastes produzirão no ano seguinte. (NEZI et al., no prelo).

A cultivar Brazos de amoreira-preta é um F<sub>2</sub> resultante do cruzamento das cultivares Lawton (*Rubus allegheniensis* Porter x *Rubus frondosus* Bigel) e Nessberry (F<sub>3</sub> do cruzamento entre *Rubus rubrisetus* Rydb. e *Rubus trivialis* Smith x *Rubus strigosus*) (MOORE, BROWN e SISTRUNK, 1974; LOPEZ-MEDINA, MOORE e McNEW, 2000).

## 2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE AMOREIRA

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel, em 1960, ao multiplicar orquídeas mediante ápices caulinares e regeneração de protocormos. Em muitos países, a micropropagação comercial já é bastante utilizada, principalmente em países da Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, no entanto, a micropropagação é uma técnica relativamente recente (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Encontram-se trabalhos em micropropagação de amoreira, no entanto, as taxas de multiplicação alcançadas não são altas o suficiente para viabilizar produções comerciais (HOEPFNER e NESTBY, 1991). Da mesma maneira, GRAHAM, IASI e MILLAM (1997) relatam que tem sido difícil o desenvolvimento de um sistema de regeneração eficiente e amplo em *Rubus* spp. Vários meios de cultura têm sido descritos para a regeneração, porém, com baixa eficiência ou eficientes para apenas alguns genótipos, geralmente aqueles com genes de *Rubus fruticosus* no seu genoma. Ainda, MILLÁN-MENDOZA (1998) destaca que plantas lenhosas têm uma regeneração difícil *in vitro* e que o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas inteiras a partir da cultura de tecidos traria muitos benefícios a várias espécies lenhosas.

Uma das vantagens da propagação de plantas do gênero *Rubus* através da cultura de tecidos a partir de meristemas é a possibilidade de produção de plantas em condições assépticas, livres de vírus, especialmente quando o explante de origem é um meristema e quando a técnica é combinada com a termoterapia da planta matriz (PYOTT e CONVERSE, 1981; SWARTZ, GALLETTA e ZIMMERMAN, 1983; HOEPFNER e NESTBY, 1991).

A cultura de tecidos é uma importante técnica para a rápida propagação clonal de plantas para prover estoques de alto padrão sanitário, especialmente em espécies frutíferas lenhosas, nas quais a limpeza em relação a doenças viróticas e à podridão das raízes causada por *Phytophthora* é de muita importância antes do estabelecimento a

campo, porque essas doenças não podem ser erradicadas depois de introduzidas (WILLIAMSON et al., 1998).

Outra vantagem seria a possibilidade de produção de forma mais acelerada e facilmente programável (SWARTZ, GALLETTA e ZIMMERMAN, 1983). Portanto, a técnica de micropropagação a partir de clones selecionados poderia levar a um aumento de produção, atendendo à demanda crescente da fruta de amora (RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA, 1990).

A cultura de tecidos é uma técnica que pode propiciar diversos avanços no melhoramento de plantas, sendo de fundamental importância para diversas técnicas (McNICOL e GRAHAM, 1992). Os autores descrevem algumas técnicas de melhoramento em *Rubus*, desenvolvidas a partir da cultura de tecidos e, entre elas, a obtenção de variação somaclonal, a produção de plantas haplóides, a fusão de protoplastos e a transformação genética. À medida que novos genes para amoreira são isolados, caracterizados e se tornem disponíveis para testes de transformação genética, haverá uma demanda das técnicas de cultura de tecidos por parte de indústrias relacionadas à agricultura, horticultura e florestas (FIOLA et al., 1990; HOEPFNER et al., 1993; SCHUERMAN e DANDEKAR, 1993; WILLIAMSON et al., 1998).

Outra utilização da micropropagação em amoreira é a conservação *in vitro* de germoplasma. Considera-se de grande rentabilidade e utilidade em relação à conservação *in situ*, pois há a possibilidade de armazenamento de grande quantidade de plantas em espaços reduzidos, livres de doenças e pragas, com baixa exigência de mão-de-obra para a sua manutenção. Todos esses aspectos levam a uma diminuição de custos e de espaço na conservação de germoplasma (RAMÍREZ et al., 1998).

Uma das desvantagens apresentadas em relação à micropropagação de amoreira é o alto custo de todo o processo, contudo, essa desvantagem pode ser compensada pela produção de mudas de mais alta qualidade em relação às mudas tradicionalmente propagadas. SWARTZ, GALLETTA e ZIMMERMAN (1983) observam que apesar dos custos ainda não terem sido bem determinados, há vários laboratórios comerciais produzindo mudas micropropagadas de *Rubus*.



Outra desvantagem seria a possibilidade de ocorrência da variação somaclonal, que pode ser descrita como um tipo de variação genética espontânea que ocorre em plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos. Segundo KARP (1995), ela é uma desvantagem na cultura de tecidos quando se trabalha com propagação vegetativa, já que neste caso não se busca nenhum tipo de variabilidade, pois se pretende a clonagem e manutenção de um determinado genótipo. Mas há diversos trabalhos que descrevem algumas precauções a serem tomadas para evitar esse tipo de ocorrência na cultura de tecidos e controlá-la. SWARTZ, GALLETTA e ZIMMERMAN (1983), ao testarem a ocorrência de diferenças fenotípicas entre as plantas produzidas *in vitro*, observaram que o uso de técnicas comerciais de cultura de tecidos para propagação de amoreiras-pretas geneticamente sem espinhos resultou em plantas com vigor uniforme e características fenotípicas similares às plantas propagadas tradicionalmente.

### 2.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *IN VITRO*

Entre os muitos fatores que afetam a organogênese, a temperatura de incubação e a radiação fotossintética são muito importantes para a regeneração e têm sido estudados na regeneração de tecidos foliares de amoreira vermelha (*Rubus idaeus*) (COSINEAU e DONNELLY, 1991) e em cotilédones de amoreira preta (*Rubus* spp.) (FIOLA et al., 1990). As diferentes temperaturas, o fotoperíodo, as intensidades luminosas e os tipos de lâmpadas usados na micropropagação de amoreira (*Rubus*) podem ser observados no Quadro 1.

TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994), em pesquisa de regeneração de gemas adventícias a partir de folhas de vários genótipos de *Rubus* cultivados *in vitro*, verificaram que a regeneração foi afetada pelos componentes do meio de cultura e pelas condições de incubação. As folhas cultivadas a 20°C com um fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  tiveram a maior taxa de regeneração e o maior número de brotos por folha, em comparação às cultivadas a 25°C com um fluxo fotossintético de 40 ou

80  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os autores concluíram que a temperatura foi mais importante na promoção da organogênese a partir de explantes foliares do que as diferenças de fluxo fotossintético avaliadas no trabalho.

QUADRO 1 - Condições de temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa e tipo de lâmpadas utilizadas na sala de cultivo para a micropropagação de amoreira (*Rubus spp.*)

continua

AUTOR	TEMPERATURA	FOTOPERÍODO	INTENSIDADE LUMINOSA	TIPO DA LÂMPADA
CARRILLO e MENDOZA (1979)	26-28°C	escuro por 15 dias		Fluorescente branca
McPHEETERS e SKIRVIN (1983)	23°C	16 horas	2,2 klx	
DONNELLY e VIDAVER (1984b)	25°C		2 a 6 klx	Fluorescente branca fria
BORGMAN e MUDGE (1986)	24°C	16 horas	80 a 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
HALL, QUAZI e SKIRVIN (1986)	22°C $\pm$ 3°C	16 horas	luz difusa nas primeiras 4 semanas e, depois, 10.000 lux	
DONNELLY, SKELTON e NELLES (1987)	27-28°C	16 horas	25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
FIOLA et al. (1990)	20 a 22°C	16 horas	30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
		1, 2 ou 4 semanas iniciais no escuro e fotoperíodo de 16 horas	30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
		16 horas ou escuro contínuo	21, 45 ou 81 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria ou branca soft
McNICOL e GRAHAM (1990)	20°C	16 horas		Fluorescente branca
RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990)	24°C no claro 28°C no escuro	18 horas		
SWARTZ et al. (1990)	20°C	2 semanas iniciais no escuro e, após este período, 16 horas de luz	30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
COUSINEAU e DONNELLY (1991)	21°C	16 horas	50,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
	25°C	escuro inicial de 1, 2 ou 3 semanas		
HOEPFNER e NESTBY (1991)	25°C – claro 22°C – escuro	16 horas		Fluorescente 36W/29
JIN, GU e ZHEN (1992)	25°C	16 horas	2000 lx ao nível das plantas	
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993a)	23°C $\pm$ 1°C	contínuo escuro ou 16 horas de luz	30 $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993b)	23°C $\pm$ 1°C	contínuo escuro ou 16 horas de luz	30 $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	

QUADRO 1 - Condições de temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa e tipo de lâmpadas utilizadas na sala de cultivo para a micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

conclusão

AUTOR	TEMPERATURA	FOTOPERÍODO	INTENSIDADE LUMINOSA	TIPO DA LÂMPADA
DENG e DONNELLY (1993b)	25 ± 3°C	16 horas	55 ± 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
GINGAS e STOKES (1993)	24°C		70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca fria
KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993)	25°C ± 1°C	16 horas	3000 lux	Fluorescente branca fria
BOREJSZA-WYSOCKI e HRAZDIN (1994)	25°C	escuro		
TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994)	20°C e 25°C	1 semana no escuro 16 horas de fotoperíodo	40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	
	25°C		80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	
HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996)	25°C – claro 22°C – escuro	16 horas		Fluorescente 36W/29
ZIMMERMAN, BHARDWAJ e FORDHAM (1995)	25°C	16 horas	40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca
GRAHAM, IASI e MILLAM (1997)	20° C	16 horas	70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Fluorescente branca
MILLÁN-MENDOZA (1998)	20°C	16 horas	70 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}$	Fluorescente branca
RAMÍREZ et al. (1998)	15°C ± 2°C nas 2 semanas iniciais e 20°C ± 2°C após 2 semanas	Escuro por duas semanas 16 horas		
ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo)	25°C ± 2°C	16 horas	25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	
NEZI et al. (no prelo)	25°C ± 2°C	16 horas	19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	

Os resultados observados por TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994), com relação à intensidade luminosa, confirmam os encontrados por FIOLA et al. (1990), nos quais a intensidade luminosa, ao variar de 0 a 81  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , não afetou a porcentagem de organogênese a partir de cotilédones de *Rubus*. SOBCZYKIEWICZ (1992) constatou que as temperaturas ideais para amoreira estiveram entre 20 e 27°C, pois temperaturas abaixo de 20°C tiveram uma influência negativa para o desenvolvimento das plântulas de amoreira.

Por outro lado, COSINEAU e DONNELLY (1991) descreveram que variações na temperatura de incubação não influenciaram a regeneração de brotos de amoreira a partir de pecíolos.

Segundo FIOLA et al. (1990), duas semanas iniciais de contínuo escuro não aumentaram a porcentagem de regeneração a partir de explantes de folhas de amoreira. Da mesma maneira, COUSINEAU e DONNELLY (1991) constataram que a incubação no escuro por 1, 2 ou 3 semanas antes do crescimento, em ensaio de regeneração de gemas a partir de pecíolos de amoreira, não influenciou a porcentagem de regeneração, mas diminuiu o número de gemas adventícias. Isso pode ter ocorrido porque a incubação preliminar no escuro retardou a iniciação dos brotos.

McNICOL e GRAHAM (1990), ao estudarem a regeneração em *Rubus*, observaram que não ocorreu a regeneração na ausência de luz.

#### 2.4 PROCESSOS DE MICROPROPAGAÇÃO UTILIZADOS EM ESPÉCIES DE *Rubus*

Já foi descrita a propagação diretamente por crescimento das gemas pré-existent, através de utilização de meristemas, gemas ou segmentos nodais (Quadro 2).

Também foi relatada a regeneração de gemas adventícias (organogênese) de *Rubus* a partir de folhas, pecíolos, segmentos internodais, cotilédones, embriões imaturos e raízes (Quadro 2).

A embriogênese somática, por sua vez, foi obtida utilizando-se cotilédones, embriões imaturos e óvulos imaturos (Quadro 2).

QUADRO 2 - Espécies, cultivares, processos, fontes e tipos de explantes e procedimentos de assepsia utilizados na micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

AUTOR	ESPÉCIE E/OU CULTIVAR	PROCESSO UTILIZADO	FONTE DO EXPLANTE	TIPO DE EXPLANTE	ASSEPSIA
CARRILLO e MENDOZA (1979)	Cv. Himalaya	Proliferação de gemas axilares		Gemas (3 a 4 mm)	1º: Selamento das extremidades de segmentos de caule de 5 cm de comprimento com parafina fundida; 2º: Lavagem dos segmentos com água de torneira; 3º: Etanol (70%) (v/v) - 30s; 4º: Hipoclorito de cálcio (2%) (p/v) e Tween 20 (0,5%) - 30 min; 5º: Lavagem por seis vezes com água destilada esterilizada.
SWARTZ, GALLETTA e ZIMMERMAN (1983)	Cv. Black Satin, Dirksen Thornless, Hull Thornless, Smoothstem, Thornfree, SI-US 68-6-17	Proliferação de gemas		Gema apical (1 cm)	
DONNELLY e VIDAVER (1984b)	Cruzamento Haida x Canby	Proliferação de gemas		Gema apical	
FIOLA e SWARTZ (1985)	Cultivares Black Satin, C-1, Cheyenne, Thornless Boysenberry e Tayberry	Organogênese e embriogênese		Embriões imaturos	
BORGMAN e MUDGE (1986)	<i>Rubus idaeus</i> , cv. Tupy	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Raízes	
HALL, QUAZI e SKIRVIN (1986)	Cv. Thornless Longanberry	Organogênese	Plantas cultivadas em casa de vegetação	Meristema apical (0,5 mm)	1º: Etanol (70%) - 30s; 2º: Hipoclorito de sódio (0,32%) - 20 min; 3º: Três lavagens em água estéril.
DONNELLY, SKELTON e NELLES (1987)	Cv. Silvan			Gema apical (1 a 5 cm de comprimento)	
FIOLA et al. (1990)	Cultivares Lochness, Marion x Thornless Boysenberry, MD-ETCE-1 (Black Satin x Tayberry)	Organogênese e embriogênese somática	Plantas cultivadas em casa de vegetação e <i>in vitro</i>	Cotilédones e folhas	1º: Esterilização superficial dos frutos com hipoclorito de sódio (0,53%) - 15 min; 2º: Três lavagens em água estéril.
SWARTZ et al. (1990)		Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	3 folhas apicais	

QUADRO 2 - Espécies, cultivares, processos, fontes e tipos de explantes e procedimentos de assepsia utilizados na micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

continuação

AUTOR	ESPÉCIE E/OU CULTIVAR	PROCESSO UTILIZADO	FONTE DO EXPLANTE	TIPO DE EXPLANTE	ASSEPSIA
McNICOL e GRAHAM (1990)	Cultivares Autumn Bliss, Tayberry, Tummelberry e Sunberry	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Discos foliares (6 mm diâmetro) e segmentos internodais sem gemas axilares (1 cm de compr.) com pele ou sem pele	
RAMÍREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990)	<i>Rubus glaucus</i>	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas em casa de vegetação	Gemas axilares ativas, eliminando-se os primórdios foliares mais externos	1º: Benomil (400 mg.L <sup>-1</sup> ) e sulfato de estreptomicina (100 mg.L <sup>-1</sup> ); 2º: Hipoclorito de sódio (0,5%, 1% ou 2%) - 5 ou 10 min.
COUSINEAU e DONNELLY (1991)	<i>Rubus idaeus</i> e <i>Rubus x neglectus</i>	Organogênese	Plantas cultivadas em casa de vegetação	Quadrados de folhas	1º: Água corrente - 30 min; 2º: Solução (10%) de alvejante (contendo hipoclorito de sódio a 5,25%) - 15 min; 3º: Duas lavagens em água destilada estéril - 5 min.
			Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Pecíolos foliares (0,5 a 1,5 cm <sup>2</sup> de folhas com metade do pecíolo)	
HOEPFNER e NESTBY (1991)	Cultivares N71-B3 (Distad x Viking) e N71-2709 (Viking x Veten)	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas no campo	Meristema de gemas apicais e laterais (com 2 ou 4 primórdios foliares)	1º: Etanol (70%) - 2 min; 2º: Alvejante comum caseiro a 10% (Klorin®) - 12 min; 3º: Três lavagens em água destilada estéril.
JIN, GU e ZHEN (1992)	<i>Rubus hirsutus</i> , <i>R. columellaris</i> , <i>R. lambertianus</i> e <i>R. alceaefolius</i>	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas no campo	Gemas apicais e axilares (1 a 2 cm de comprimento)	1º: Etanol (70%) - 30s; 2º: HgCl <sub>2</sub> (0,5%) - 4 min; 3º: Cinco lavagens com água destilada.
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993a)	Cultivares Hull Thornless, Thornfree e Comanche	Produção de calo		Endosperma de sementes	
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993b)	Cultivares Hull Thornless, Thornfree e Comanche	Organogênese e embriogênese somática		Embriões imaturos com metade do endosperma	1º: HgCl <sub>2</sub> (0,1%) - 20 min; 2º: Três lavagens em água estéril.
GINGAS e STOKES (1993)	<i>Rubus occidentalis</i> , cv. Bristol e Jewel e <i>R. idaeus</i> , cv. Exp-72	Organogênese e embriogênese somática	Plantas cultivadas no campo	Cotilédones (0,5 a 1,0 mm)	1º: Desinfecção superficial das sementes com hipoclorito de sódio (0,5%) e Alconox (0,5%) - 15 min; 2º: Duas lavagens em água destilada estéril - 30s.

QUADRO 2 - Espécies, cultivares, processos, fontes e tipos de explantes e procedimentos de assepsia utilizados na micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

continuação

AUTOR	ESPÉCIE E/OU CULTIVAR	PROCESSO UTILIZADO	FONTE DO EXPLANTE	TIPO DE EXPLANTE	ASSEPSIA
KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK, 1993	Cv. Schonemann	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas no campo	Gemas apicais (0,5 a 0,7 mm)	1º: Alvejante comercial a 10% (0,52% de hipoclorito de sódio) com Tween 20 (1%) - 10 min; 2º: Três lavagens em água deionizada estéril.
BOREJSZA-WYSOCKI e HRAZDIN (1994)	<i>Rubus idaeus</i> , cv. Royalty	Produção de calo e suspensão celular	Plantas cultivadas no campo	Seções foliares	1º: Lavagem em água corrente 2º: Etanol (70%) (v/v) - 30s; 3º: HgCl <sub>2</sub> (0,2%) (p/v) mais Tween 20 (0,01%) - 10 min; 4º: Cinco lavagens em água destilada estéril - 15 min.
TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994)	Cultivares Canby, Sentry, Summit e Autumm Bliss	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	4 folhas expandidas superiores, sem os pecíolos.	
ZIMMERMAN, BHARDWAJ e FORDHAM (1995)	<i>Rubus idaeus</i> , cultivares Autumm Bliss e Canby	Crescimento das gemas pré-existent	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Gemas apicais (1 a 2 cm de comprimento)	
HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996)	Cv. N71-B3 (Distad x Viking)	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Meristemas (2 a 4 primórdios foliares)	
GRAHAM, IASI e MILLAM (1997)	Cultivares Autumm Bliss, Glen Moy, Glen Clova, Glen Prosen, Loch Ness, Chester, Hull Thornless e Tayberry	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Seções foliares e segmentos internodais (3 a 5 cm de comprimento) sem pele	
MILLÁN-MENDOZA (1998)	<i>Rubus idaeus</i> , cultivares Glen Moy, Glen Prosen e Glen Magna; <i>R. loganobaccus</i> , cv. Tayberry e <i>R. fruticosus</i> , cv. Loch Ness	Organogênese	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Segmentos internodais (0,1 cm de comprimento) e discos foliares	
RAMÍREZ et al. (1998)	<i>Rubus acanthophyllus</i> , <i>R. compactus</i> , <i>R. floribundus</i> , <i>R. macrocarpus</i> , <i>R. bogotensis</i> , <i>R. glaucus</i> , <i>R. magalococcus</i> , <i>R. urticaefolius</i> e <i>R. porphyromallus</i>	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas em casa de vegetação	Segmentos nodais (1 a 2 cm de comprimento)	1º: Detergente Teepol (1%) 2º: Fungicidas (benlate e ortocide 2 g.L <sup>-1</sup> ) - 30 min; 3º: Hipoclorito de sódio (2,5%) mais Tween 20 (1%) - 20 min.
ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo)	<i>Rubus idaeus</i> , cv. Tupy	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Segmentos caulinares com duas gemas do ápice	

QUADRO 2 - Espécies, cultivares, processos, fontes e tipos de explantes e procedimentos de assepsia utilizados na micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

					conclusão
AUTOR	ESPÉCIE E/OU CULTIVAR	PROCESSO UTILIZADO	FONTE DO EXPLANTE	TIPO DE EXPLANTE	ASSEPSIA
NEZI et al. (no prelo)	<i>Rubus</i> sp., cv. Guarani	Proliferação de gemas	Plantas cultivadas <i>in vitro</i>	Segmentos nodais com 2 a 3 gemas axilares	

## 2.5 FASE DE CULTIVO INICIAL

A fase de cultivo inicial é adequada de acordo com método de micropropagação utilizado, entre eles, a proliferação direta por brotação das gemas, a organogênese ou a embriogênese somática. No caso da proliferação de gemas, o objetivo a ser alcançado na fase de cultivo inicial será estimular a brotação das gemas existentes, com bom crescimento, para que em pouco tempo o explante possa iniciar o processo de multiplicação. No caso da organogênese, o objetivo do cultivo inicial será a estimulação de brotos adventícios. E no caso da embriogênese somática, o objetivo será provocar o surgimento de embriões somáticos. Cada objetivo necessitará de condições específicas e, portanto, devido ao método utilizado, teremos diferentes meios de cultura, reguladores de crescimento adequados, tipos dos explantes, tempo de cultivo, luminosidade, temperatura, entre outras condições.

A seguir, detalha-se cada uma das variáveis do cultivo inicial descritas para amoreira (*Rubus* spp.).

### 2.5.1 Fontes dos explantes

Em uma primeira etapa, os explantes a serem micropropagados são retirados de uma planta-matriz, que pode ser tanto cultivada em campo, como em casa de



vegetação, ou, ainda, cultivada *in vitro*. Esses dados podem ser observados no Quadro 2.

Segundo COUSINEAU e DONNELLY (1991), a fonte do explante de amoreira, por exemplo, se proveniente de plantas micropropagadas ou cultivadas em casa de vegetação, afeta a capacidade de estabelecimento e a regeneração *in vitro*.

Alguns fatores relacionados à fonte dos explantes são muito importantes e devem ser considerados para que se obtenha um eficiente estabelecimento e a regeneração *in vitro*. Alguns deles são: estado fitossanitário, estado fisiológico ativo ou não, fatores genéticos (RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA, 1990; JIN, GU e ZHEN, 1992), estado nutricional das plantas e fase de crescimento em que elas se encontram (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), o estado fitossanitário da planta-matriz é importante, pois na desinfecção superficial os microorganismos de natureza endógena não estão expostos aos agentes desinfetantes. Se eles já forem controlados na planta-matriz, será mais fácil descontaminar o explante durante o isolamento. Portanto, deve-se manter a planta-matriz em ambiente limpo, como uma casa de vegetação ou câmara de crescimento, onde ela estaria menos exposta a todo tipo de intempérie ou a insetos que provocam ferimentos, o que permite a entrada de microorganismos.

Alguns autores estudaram a época de retirada dos explantes, relacionado ao estado fisiológico destes. JIN, GU e ZHEN (1992), por exemplo, em trabalho de proliferação de gemas axilares de amoreira, indicaram que gemas retiradas de plantas que não estão mais dormentes são mais fáceis de cultivar *in vitro*. Para as espécies *Rubus hirsutus*, *Rubus columellaris* e *Rubus lambertianus*, o início da primavera mostrou ser a melhor estação de retirada do explante, enquanto para *Rubus alceaefolius*, o início do verão apresentou melhores resultados. GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), da mesma maneira, recomendam a retirada dos explantes a partir de brotações novas, após o final do período de dormência, durante os meses mais quentes do ano (primavera e verão). CARRILLO e MENDOZA (1979) retiraram fragmentos de caule de amoreira nos meses de agosto e setembro, e HOEPFNER e

NESTBY (1991) selecionaram somente os brotos jovens em crescimento vigoroso para a retirada de meristemas apicais de amoreira. WELANDER (1985), em trabalho com amoreira (*Rubus idaeus*) cv. Vetén, concluiu que o meristema retirado da planta na época de crescimento dos ramos resultou em maior taxa de estabelecimento inicial e em menor taxa de contaminação, comparativamente ao meristema de gemas dormentes.

### 2.5.2 Tipos de explantes

Podem ser utilizados diversos tipos de explantes para iniciar a propagação *in vitro* (Quadro 2). Para a escolha do explante deve-se levar em conta o nível de diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação. Em geral, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Ainda segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), o tamanho do explante depende do objetivo da micropropagação. No caso de eliminação de algum microorganismo, deve-se utilizar o menor explante possível ou o mais distante de regiões vascularizadas. No entanto, HOEPFNER e NESTBY (1991), em trabalho de regeneração a partir de meristemas de amoreira com 2 ou 4 primórdios foliares, obtiveram baixa taxa de sobrevivência. Os autores explicam que essa baixa taxa alcançada pode ter sido causada pelo pequeno tamanho do explante, e sugerem que seria benéfico usar gemas apicais de tamanho maior, no caso do material doador estar livre de doenças, buscando melhorar a taxa de sobrevivência dos explantes.

MILLÁN-MENDOZA (1998) constatou em seu trabalho com amoreira que a capacidade de regeneração é dependente do tipo de explante usado e do genótipo. Também observou que nenhuma regeneração foi obtida a partir de discos foliares, enquanto a regeneração a partir de segmentos internodais ocorreu em todos os genótipos testados. SWARTZ et al. (1990), da mesma maneira, observaram que o

potencial organogênico varia bastante devido ao órgão da planta utilizado e às diferentes fases de desenvolvimento dos tecidos. Os cotilédones são freqüentemente usados como fonte de material para regeneração de gemas por causa do seu excelente potencial organogênico. Confirmando o acima exposto, FIOLE et al. (1990) observaram que os cotilédones de *Rubus* foram capazes de apresentar duas vias de desenvolvimento – organogênese e embriogênese somática. Em contraste, quando os explantes utilizados foram folhas, observou-se somente a formação de gemas adventícias, sem a ocorrência da embriogênese somática.

No entanto, GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) advertem que, na propagação a partir de embriões e tecidos de sementes, ou ainda de ápices e gemas laterais isolados de plântulas germinadas em condições assépticas, está se propagando um genótipo desconhecido, que pode ou não ser de interesse.

No estudo da regeneração de amoreira, McNICOL e GRAHAM (1990) observaram uma freqüência maior de regeneração em segmentos internodais sem a cutícula externa (64%), em relação aos segmentos intactos (20%).

Já TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994) observaram que as duas folhas mais jovens expandidas nas proximidades do ápice foram as mais regenerativas e produziram o maior número de brotos por folha em relação às folhas em outras posições no ramo de amoreira.

No entanto, COUSINEAU e DONNELLY (1991) não obtiveram diferença na regeneração de gemas de amoreira usando pecíolo foliar ou folha e nem utilizando diferentes posições dos pecíolos nos meios de cultura. Em contraposição, no trabalho de McNICOL e GRAHAM (1990), a posição dos discos foliares (com a superfície adaxial para cima) foi um fator importante na regeneração de plântulas de amoreira.

Além disso, McNICOL e GRAHAM (1990) perceberam em amoreira que os discos foliares produziram mais plântulas por explante, em comparação aos segmentos internodais. Há indícios de que as condições necessárias para a regeneração de plântulas a partir de discos foliares sejam mais críticas do que as exigidas por segmentos internodais.

### 2.5.3 Assepsia

As contaminações na cultura de tecidos podem causar grandes prejuízos no processo de micropropagação, deixando o explante inapto para o subcultivo e levando-o à morte. Esses problemas são aumentados quando a contaminação não se expressa durante os estádios iniciais e somente é detectada durante o fluxo de produção, causando diminuição da produtividade. Além disso, no caso de inspeções sanitárias e certificações, apenas uma planta contaminada pode comprometer todo um lote (CASSELS, 1991).

O processo inicial de assepsia na micropropagação apresenta a dificuldade de encontrar-se um equilíbrio entre o ponto ideal de desinfecção superficial do tecido e a sobrevivência deste quando isolado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Há diversos trabalhos com a descrição da desinfecção superficial de tecidos de amoreira. Em geral, tem-se utilizado a lavagem em água corrente por alguns minutos, e em seguida a imersão dos explantes em solução de etanol a 70%, hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ), hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), Tween 20, fungicidas e posteriores lavagens sucessivas em água estéril. Esses procedimentos podem ser observados no Quadro 2.

O etanol é geralmente utilizado pela sua ação germicida, surfactante e de dissolução das gorduras. Portanto, aplicado inicialmente, pode auxiliar a ação dos outros produtos. O Tween 20 é um detergente, com ação também surfactante. E pode, muitas vezes, ser substituído por detergente de cozinha (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O hipoclorito de sódio tem sua ação bactericida devido ao ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e ao íon  $\text{OCl}^-$ . A sua atividade está relacionada à sua capacidade oxidante (GEORGE, 1993). Além disso, esse produto tem a vantagem de ser facilmente encontrado.

Um ponto importante a ser considerado no que se refere às concentrações das soluções desinfetantes, assim como às combinações dos princípios ativos e ao tempo

de exposição, é que eles deverão ser definidos de acordo com a sensibilidade do tecido a ser isolado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

WELANDER (1985) observaram que os meristemas retirados de gemas dormentes de amoreira tiveram um nível de contaminação bem maior do que quando os meristemas vieram de gemas em crescimento.

No entanto, há poucas pesquisas em amoreira que comparem os diferentes métodos de desinfecção superficial. Além disso, os trabalhos sobre micropropagação não mencionam os níveis de contaminação encontrados.

#### 2.5.4 Antioxidante

Um dos problemas que ocorrem freqüentemente no cultivo *in vitro* é a oxidação dos tecidos das plantas isoladas, principalmente das lenhosas. Segundo RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990), a oxidação se deve, principalmente, à presença de compostos altamente oxidantes, como o íon superóxido, metais oxidantes e compostos de tipo fenólico.

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) mencionam que os produtos da oxidação são tóxicos ao resto do explante e se difundem no meio de cultura, escurecendo-o. Os autores apresentam algumas possíveis técnicas para reduzir esse problema, tais como: 1) a lavagem, em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfecção superficial, para que se consiga uma lixiviação de compostos fenólicos; 2) a utilização de algumas substâncias como o ácido ascórbico, ácido cítrico, PVP (polivinilpirrolidona) e carvão ativado, seja no meio de cultura ou na forma de banho; 3) a incubação inicial dos explantes no escuro ou sob intensidade luminosa reduzida; 4) a utilização de meios de cultura básicos mais diluídos e a redução de concentrações de fitorreguladores, principalmente as citocininas; 5) as transferências freqüentes dos explantes, eliminando as porções escuras de tecido, ou a renovação de meio de cultura, no caso de meio de cultura líquido.

Especificamente para a amoreira, RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) indicam que os tecidos se oxidam facilmente. Em seus estudos neste tema, os autores determinaram como melhor antioxidante para gemas o ácido ascórbico ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) adicionado à solução nutritiva. Observaram, também, que não era necessário realizar o subcultivo em meio de cultura fresco. RAMÍREZ et al. (1998), depois da desinfecção superficial, submeteram os explantes a quatro lavagens em uma solução de antioxidantes (ácido cítrico e ácido ascórbico, na concentração de  $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ ).

#### 2.5.5 Meio de cultura

São os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas que irão fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos. Os meios de cultura deverão suprir as demandas normais das plantas, pois as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas na técnica de cultivo *in vitro*. Mas, além disso, deverão atender às necessidades específicas *in vitro*, já que alguns processos, como a fotossíntese, por exemplo, podem se tornar inativos pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Para complementar as substâncias biossintetizadas pela planta, são adicionados vários compostos orgânicos para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA, 1998).

Tem-se utilizado diferentes meios de cultura de diferentes composições, fazendo parte da composição dos meios de cultura: água, macronutrientes e micronutrientes minerais, carboidratos, vitaminas, mio-inositol, ágar (e semelhantes), reguladores de crescimento, entre outros aditivos. No Quadro 3, pode-se observar as diferentes composições dos meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro* de amoreira (*Rubus* spp.).

De acordo com MILLÁN-MENDOZA (1998), há vários tipos de meios de cultura descritos para o cultivo de *Rubus* spp., mas novos fatores de crescimento

devem ser examinados de modo a aumentar a eficiência do processo. McNICOL e GRAHAM (1990) constataram que o tipo e a concentração de regulador de crescimento, a quantia de sacarose, a ausência de carvão ativado e a presença de luz foram fatores fundamentais na regeneração de plântulas de amoreira.

QUADRO 3 - Meios de cultura, reguladores de crescimento e outros aditivos utilizados na fase de cultivo inicial da micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

continua

AUTOR	TIPO	REGULADORES DE CRESCIMENTO	OUTROS ADITIVOS
CARRILLO e MENDOZA (1979)	CRESSWELL e NITSCH <sup>1</sup> , citados por CARRILLO e MENDOZA (1979), completo e com a concentração de sais reduzida à metade, com ágar (5,5 g.L <sup>-1</sup> )		Água de coco 5% ou 10% (v/v) ou aguamel 5 ou 10% (v/v) ou mel de abelha 2,5 ou 5% (v/v); Sacarose nos meios de cultura sem aguamel ou mel.
FIOLA et al. (1990)	MS, com ágar (8 g.L <sup>-1</sup> )	TDZ (5 µM) e AIB (0,5µM) ou BAP, TDZ e ZEA (0 ou 10 µM)	Vitaminas Staba (Staba, 1969); Sulfato de adenina (0,2 mM); L-ascorbato (0,1mM); Inositol (550 µM); Sacarose (0,09 M); Caseína hidrolisada (100 mg.ml <sup>-1</sup> ).
		BAP (0 ou 5 µM)	
		TDZ (0, 5, 10 ou 20 µM)	
		BAP, TDZ e ZEA (5 ou 20 µM)	
		TDZ (0, 0,5, 1,5, 5, 15 ou 50 µM)	
McNICOL e GRAHAM (1990)	AND e WPM	TDZ (5, 10 ou 20 µM)	Sacarose (20 ou 30 g.L <sup>-1</sup> )
		AIB (0; 0,05; 0,1; 0,2 ou 2 mg.L <sup>-1</sup> ) BAP (0; 0,2; 1; 2; 2,5 ou 4 mg.L <sup>-1</sup> ) GA <sub>3</sub> (0; 2 ou 2,5 mg.L <sup>-1</sup> ) 2,4-D (0; 0,05 ou 0,2 mg.L <sup>-1</sup> )	
RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990)	MS	ANA (0,1 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com AG <sub>3</sub> (0,1 mg.L <sup>-1</sup> ) e CIN (0, 1 ou 5 mg.L <sup>-1</sup> ) ou BAP (0, 2 ou 4 mg.L <sup>-1</sup> )	
		CIN (0, 1 ou 5 mg.L <sup>-1</sup> ) combinada com BAP (0, 2 ou 4 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com AG <sub>3</sub> (0, 0,1, 2 ou 2 mg.L <sup>-1</sup> )	
COUSINEAU e DONNELLY (1991)	MS, com ágar (6 g.L <sup>-1</sup> )	BAP (0; 0,5; 1, 2 ou 4 mg.L <sup>-1</sup> ), combinado com AIB (0; 0,1; 0,5 ou 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ) ou TDZ (0; 0,5; 1; 2 ou 4 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com AIB (0; 0,1; 0,5 ou 1,0 mg.L <sup>-1</sup> )	Tiamina-HCl (2 mg.L <sup>-1</sup> )
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993a)	MS, com ágar (0,7%)	Diferentes combinações de diversos reguladores (AIA, ANA, 2,4-D, 2iP, BAP, ZEA e AG <sub>3</sub> )	Sacarose (3%); Ácido ascórbico (2 mg.L <sup>-1</sup> ); Caseína hidrolisada (400 mg.L <sup>-1</sup> )
CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993b)	MS, com ágar (0,7%)	Diferentes combinações de diversos reguladores (AIA, ANA, 2,4-D, 2iP, BAP, ZEA e AG <sub>3</sub> )	Sacarose (3%); Com ou sem caseína hidrolisada (400 mg.L <sup>-1</sup> ); Com ou sem ácido ascórbico (2 mg.L <sup>-1</sup> ).

<sup>1</sup> CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. *Planta*, v. 125, p. 87-90, 1975.

QUADRO 3 - Meios de cultura, reguladores de crescimento e outros aditivos utilizados na fase de cultivo inicial da micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)  
conclusão

AUTOR	TIPO	REGULADORES DE CRESCIMENTO	OUTROS ADITIVOS
GINGAS e STOKES (1993)	MS, com Gelrite (0,25%)	2,4-D (0; 0,45 ou 4,5 $\mu\text{M}$ )	Caseína hidrolisada (200 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Sacarose (3%).
KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993)	MS, com ágar (7 $\text{g.L}^{-1}$ )	BAP (0,2, 0,5 ou 1 $\text{mg.L}^{-1}$ ), combinado com AIB (0,01, 0,5 ou 1 $\text{mg.L}^{-1}$ ), combinados com $\text{AG}_3$ (0,1 ou 0,2 $\text{mg.L}^{-1}$ )	Mio-inositol (100 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Tiamina HCl (0,4 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Sacarose (30 $\text{g.L}^{-1}$ ).
BOREJSZA-WYSOCKI e HRAZDIN (1994)	MS e AND	2,4-D (9 $\mu\text{M}$ ), CIN (100 $\text{mg.L}^{-1}$ )	Sacarose (30 $\text{g.L}^{-1}$ )
TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994)	MS, com ágar (0,75% (p/v))	TDZ (10 $\mu\text{M}$ ) AIB (0,5 $\mu\text{M}$ )	Mio-inositol (0,56 mM); Tiamina-HCl (1,2 $\mu\text{M}$ ); Sacarose (87,6 mM).
		TDZ (1, 10 ou 20 $\mu\text{M}$ ) ou BAP (4, 20 ou 40 $\mu\text{M}$ ) e mais AIB (0,5 ou 1 $\mu\text{M}$ )	
		TDZ (0,3; 1; 3 ou 10 $\mu\text{M}$ ) AIB (0 ou 0,5 $\mu\text{M}$ )	
	MS ou MS/2 ou AND ou WPM ou o meio de CHU et al. (1975) com micronutrientes e aditivos orgânicos MS, com ágar (0,75% (p/v))	TDZ (1 $\mu\text{M}$ ) AIB (0,5 $\mu\text{M}$ )	
GRAHAM, IASI e MILLAM (1997)	MS, com ágar (9 $\text{g.L}^{-1}$ )	55 combinações dos seguintes reguladores de crescimento: BAP, 2,4-D, CIN, TDZ, ZEA, AIB e ANA	Sacarose (20 $\text{g.L}^{-1}$ ); Inositol (100 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Glicina (2 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Ácido nicotínico (0,5 $\text{mg.L}^{-1}$ ); Piridoxina-HCl (0,5 $\text{mg.L}^{-1}$ )
MILLÁN-MENDOZA (1998)	MS, com ágar	CPPU (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 $\text{mg.L}^{-1}$ )	Sacarose (20 $\text{g.L}^{-1}$ ); Inositol (100 $\text{mg.L}^{-1}$ ).

De acordo com o processo de micropropagação utilizado, pode-se optar por diferentes meios de cultura. Para a proliferação direta de gemas, WELANDER (1985), em trabalho com amoreira (*Rubus idaeus*) cv. Vetén, comparando dois meios de cultura (MS e MS com as concentrações de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reduzidas à metade), concluiu que ambos os meios de cultura propiciaram uma mesma taxa de sobrevivência inicial de meristemas, mas que, no entanto, o segundo meio de cultura levou a um maior crescimento após 5 semanas.

Para o processo de organogênese, TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994) encontraram os melhores resultados de brotação adventícia em amoreira com os meios



de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o meio de cultura de CHU et al.<sup>2</sup>, citados por TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994), em comparação aos meios de cultura MS/2, AND (ANDERSON, 1980) ou WPM (LLOYD e McCOWN, 1986). Os primeiros apresentaram o maior número de gemas regeneradas na organogênese de folha em todos os genótipos de *Rubus* testados.

Com relação aos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura, há diversas opções descritas para a amoreira (Quadro 3); entre eles se destacam citocininas como: a cinetina (CIN), a 6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina (BAP ou BA), o tidiazuron (TDZ), a isopenteniladenina (2iP) e a zeatina (ZEA); auxinas como: o ácido indolbutírico (AIB), o ácido 3-indolacético (AIA), o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e as giberelinas, como por exemplo o ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) comentam que pode ser interessante realizar um pré-condicionamento dos explantes sem a aplicação de fitorreguladores após o isolamento. Os autores explicam que eles poderiam estimular respostas indesejadas, como a formação de calo e, eventualmente, a intoxicação dos tecidos. No entanto, HOEPFNER e NESTBY (1991) constataram que os dois clones de amoreira-vermelha testados se desenvolveram com mais segurança e rapidez quando nos meios de cultura completos. Os autores observaram, em seu trabalho, que um início em meio de cultura sem reguladores de crescimento resultou em atraso no desenvolvimento e que os valores iniciais de multiplicação eram maiores em culturas estabelecidas em meio de cultura completo.

Portanto, para o processo de micropropagação pela proliferação de gemas de *Rubus glaucus*, RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) constataram como melhor resultado o tratamento com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, em comparação a 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e à CIN, testando níveis de CIN e BAP em meio de cultura suplementado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. As variáveis

---

<sup>2</sup> CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; PI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci Sinica*, v. 18, p. 659-688, 1975.

analisadas foram o número de folíolos, a presença ou a ausência de calo e o desenvolvimento de plântulas. Com isto, os autores supõem que o BAP tenha um efeito sinérgico com o ANA ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e o AG<sub>3</sub> ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) na divisão e no alongamento celular.

KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) conseguiram o melhor desenvolvimento de gemas de *Rubus* com a combinação de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP. O AIB em altas doses causou a formação de calos e de brotações curtas, o BAP em altas doses causou a vitrificação, e a adição de AG<sub>3</sub> não teve efeito positivo.

RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) ainda testaram a interação citocinina-giberelina para estabelecimento de gemas de amoreira, nas concentrações de 0, 1 e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN, 0, 2 e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e 0; 0,1; 1 e  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG<sub>3</sub>. Os melhores resultados foram obtidos com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AG<sub>3</sub> e  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

FIOLA et al. (1990), por sua vez, observaram que o TDZ tem sido tanto ou mais eficiente que o BAP na proliferação de gemas de várias espécies.

Para o processo de organogênese, CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993a), encontraram que a produção de calos a partir de endosperma de *Rubus* spp. foi induzida pela ZEA e o 2,4-D, sozinhos ou em combinação. Durante os seguintes subcultivos, o 2,4-D sozinho provou ser efetivo para manter o crescimento do calo, o que é um passo necessário para posteriores estudos em regeneração a partir de tecido de endosperma. GRAHAM, IASI e MILLAM (1997), entretanto, observaram que a ZEA não foi eficiente na regeneração de brotos a partir de discos foliares.

Alguns autores indicam que o TDZ tem sido muito eficiente para a estimulação de gemas adventícias em rosáceas, incluindo *Malus* spp., *Pyrus* spp., *Prunus* spp. e *Rubus* spp (TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN, 1994), chegando a ser mais eficiente que o BAP em várias espécies (FIOLA et al., 1990; COUSINEAU e DONNELLY, 1991).

Seguindo as observações acima, TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994), constataram que o meio de cultura contendo  $1 \mu\text{M}$  de TDZ teve a maior taxa de

regeneração em folhas de amoreira-vermelha: 'Autumn Bliss', 'Canby', 'Summit' e 'Sentry', em relação ao BAP.

FIOLA et al. (1990) também constataram que o TDZ foi significativamente mais efetivo que o BAP na indução de organogênese a partir de cotilédones e folhas de *Rubus*. No meio de cultura com BAP, a porcentagem de organogênese de gemas a partir de cotilédones teve uma média abaixo de 20%. A ótima concentração de TDZ para a organogênese a partir de cotilédones foi de 5 a 10  $\mu\text{M}$  e a partir de folhas foi de 5 a 20  $\mu\text{M}$ . Entretanto, a organogênese de brotos ocorreu em concentrações menores de TDZ, entre 0,5 a 5,0  $\mu\text{M}$ .

GRAHAM, IASI e MILLAM (1997), da mesma maneira, observaram que um mínimo de TDZ foi necessário para a regeneração de brotos a partir de discos foliares de *Rubus*. Os autores, ao testarem a suplementação de TDZ com várias auxinas individualmente, observaram que o ANA teve um efeito aditivo ao TDZ, aplicável para um variado leque de cultivares, em níveis relativamente baixos.

COUSINEAU e DONNELLY (1991), em trabalho de regeneração de gemas de amoreira a partir de pecíolos foliares, alcançaram 70% de regeneração (com média de 3,7 brotos por explante) usando 4,5 a 9,1  $\mu\text{M}$  (1 a 2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de TDZ com 2,5 a 4,9  $\mu\text{M}$  (0,5 a 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de AIB ou, então, a combinação de 2,3  $\mu\text{M}$  (0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de TDZ com 4,9  $\mu\text{M}$  (1  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de AIB no meio de cultura MS. A maior taxa alcançada com BAP em combinação com AIB foi de 50% de regeneração e 1,8 brotos por explante.

COUSINEAU e DONNELLY (1991) mostram que nos meios de cultura que não continham as citocininas TDZ ou BAP não ocorreu a regeneração de brotos a partir de pecíolos foliares de amoreira.

HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996), no entanto, constataram que o BAP deu uma porcentagem maior de regeneração do que o TDZ. Além disso, os autores observaram que baixas concentrações de reguladores de crescimento tiveram relação com uma alta regeneração e uma baixa produção de plantas não idênticas.

CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993b) também observaram que o maior número de brotações por explante de amoreira se deu nas maiores concentrações de BAP e AIA, principalmente através de organogênese direta.

MILLÁN-MENDOZA (1998) trabalharam com outro regulador de crescimento, o CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N-feniluréia), um composto sintético com atividade similar à de uma citocinina, em especial ao TDZ. Os explantes de amoreira regenerados, ao usar as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de CPPU, não passaram pelo estágio de calo, o que é uma vantagem para a transformação genética, evitando-se a variação somaclonal.

Para a estimulação da embriogênese somática em amoreira, CANTONI, BERARDI e ROSATI (1993b) encontraram o maior número de plântulas na presença de ZEA e ANA.

Com relação à auxina 2,4-D, GINGAS e STOKES (1993) afirmam que, apesar da iniciação da embriogênese somática ocorrer mais cedo em explantes cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D, os embrióides desenvolvidos em tais meios de cultura exibiram muitas anormalidades, incluindo policotiledonia, massas enraizadas e elevada produção de antocianina.

Além dos reguladores de crescimento acima descritos, há também a possibilidade da inclusão no meio de cultura de outros componentes, tais como sucos de frutas, extratos, proteínas hidrolisadas, entre outros. No entanto, essas substâncias devem ser evitadas, por terem uma composição muito variável. Apesar disso, tem-se obtido bons resultados com elas. CARRILLO e MENDOZA (1979), ao estudarem o efeito de três produtos naturais (leite de coco, 'aguamel' e mel de abelha) sobre o desenvolvimento de gemas axilares do caule de amoreira (*Rubus* sp.), cv. Himalaia, chegaram à conclusão de que os meios de cultura suplementados com água de coco e 'aguamel' induzem, preferencialmente, a produção de tecido indiferenciado em relação ao meio de cultura de CRESSWELL e NITSCH<sup>3</sup>, citados por CARRILLO e MENDOZA (1979) e ao meio de cultura suplementado com mel de abelha, onde ocorre o desenvolvimento de plântulas sem a aparente produção de tecido indiferenciado, num período de incubação de 70 dias.

---

<sup>3</sup> CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. *Planta*, v. 125, p. 87-90, 1975.

Com relação à consistência do meio de cultura, esta pode ser líquida ou sólida. Segundo CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA (1998), a cultura em meio líquido normalmente exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário à respiração do explante. Os meios de cultura líquidos possuem a vantagem de um preparo mais rápido, homogeneidade e menor custo do que os sólidos.

De acordo com CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA (1998), os meios de cultura sólidos ou semi-sólidos são, tradicionalmente, solidificados com ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. O ágar tem sido preferido para gelificação de meios de cultura, embora o amido também tenha sido utilizado com vantagem.

As concentrações de ágar utilizadas nos meios de cultura também variam. No Quadro 3, pode-se encontrar as concentrações usadas em amoreira.

No entanto, COUSINEAU e DONNELLY (1991) não encontraram influência de diferentes concentrações de ágar (2 a 10 g.L<sup>-1</sup>) na regeneração de brotos. Mas com um aumento na concentração de ágar de 6 para 8 g.L<sup>-1</sup> houve redução na vitrificação de brotos regenerados.

## 2.6 FASE DE MULTIPLICAÇÃO

Nesta fase, o principal objetivo é produzir o maior número possível de plantas, no menor espaço de tempo. Mas, além disso, deve-se considerar alguns aspectos qualitativos, tais como: obtenção do mínimo de variação de explante para explante, qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois essa característica irá determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### 2.6.1 Meio de cultura

No Quadro 4 descrevem-se os meios de cultura utilizados em amoreira na fase de multiplicação.

**QUADRO 4 - Meios de cultura, reguladores de crescimento e outros aditivos utilizados na fase de multiplicação da micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)**

AUTOR	TIPO	REGULADORES DE CRESCIMENTO	OUTROS ADITIVOS
BORGMAN e MUDGE (1986)	AND, com 1 g.L <sup>-1</sup> Gelrite	AIB (0,05 mg.L <sup>-1</sup> ) e BAP (1 mg.L <sup>-1</sup> )	
RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990)	MS	BAP (2 mg.L <sup>-1</sup> ) mais AG <sub>3</sub> (1 mg.L <sup>-1</sup> ) combinados com AIA (0, 0,1, 0,5 ou 1 mg.L <sup>-1</sup> )	
HOEPFNER e NESTBY (1991)	AND	BAP (2 mg.L <sup>-1</sup> ) AIB (0,1 mg.L <sup>-1</sup> )	
		Sem reguladores	
	MS	BAP (1 mg.L <sup>-1</sup> ) e AIB (0,1 mg.L <sup>-1</sup> )	
		Sem reguladores	
	MS	BAP (0,1 mg.L <sup>-1</sup> ) e AIB (1 mg.L <sup>-1</sup> )	
		Sem reguladores	
JIN, GU e ZHEN (1992)	MS, com ágar (5,5 g.L <sup>-1</sup> )	BAP (0, 1, 2, 4 ou 6 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com ANA (0,1 ou 0,2 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com AG <sub>3</sub> (0 ou 0,2 mg.L <sup>-1</sup> ) combinado com CIN (0 ou 2 mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido ascórbico (100 mg.L <sup>-1</sup> ); Sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> )
KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993)	MS, com ágar (7 g.L <sup>-1</sup> )	BAP (0,5, 1, 2 ou 3 mg.L <sup>-1</sup> ), combinado com AIB (0,2 ou 0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Mio-inositol (100 mg.L <sup>-1</sup> ); Tiamina HCl (0,4 mg.L <sup>-1</sup> ); Sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> )
ZIMMERMAN, BHARDWAJ e FORDHAM (1995)	MS (com a concentração de ferro dobrada), com ágar (7,5 g.L <sup>-1</sup> ) ou uma mistura de amido de milho (50 g.L <sup>-1</sup> ) mais Gelrite (0,5 g.L <sup>-1</sup> ).	BAP (4,4 µM) AIB (0,49 µM) AG <sub>3</sub> (1,3 µM)	Aditivos orgânicos de LINSMAIER e SKOOG <sup>4</sup> , citados por ZIMMERMAN, BHARDWAJ e FORDHAM (1995); Sacarose (88 mM)
ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo)	MS, com ágar (6 g.L <sup>-1</sup> )	BAP (0, 2, 4, 6, 8 e 10 µM) e AIB (0, 0,5 e 1 µM)	Sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> )
NEZI et al. (no prelo)	MS, com ágar (6 g.L <sup>-1</sup> )	BAP (0, 2, 4, 6 e 8 µM) e TDZ (0, 2, 4, 6 e 8 µM)	Sacarose (30 g.L <sup>-1</sup> )

<sup>4</sup> LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue - cultures. *Physiol. Plant.*, v. 18, p. 100-127, 1965.

De acordo com HOEPFNER e NESTBY (1991), as maiores taxas de multiplicação (3 a 4) ocorreram no meio de cultura AND, em relação ao meio de cultura MS.

Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), para o sucesso da multiplicação, o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores mais importantes a serem observados. Segundo GEORGE (1993), o efeito das citocininas na cultura de tecidos se dá no estímulo à divisão celular e no controle da morfogênese. Ela pode atuar na redução da dominância apical e liberação da dormência das gemas laterais. De acordo com HARTMANN et al. (1997), a iniciação de brotos é bastante influenciada pela concentração de citocinina adicionada ao meio de cultura.

WELANDER (1985) observou que o tratamento com BAP a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  proporcionou o maior número de brotações em amoreira em comparação com a concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ou a CIN a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Alguns autores observaram alguns efeitos indesejados de altas concentrações de citocininas. Em amoreira, HOEPFNER e NESTBY (1991) observaram que as quantias crescentes de citocinina (de 0 a  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) levaram a um aumento no número de brotações pequenas e que, no nível acima de  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , elas não tiveram maiores efeitos na multiplicação. KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993), da mesma maneira, observaram que onde as doses de BAP foram altas ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  ou mais) os brotos morreram depois de um tempo. E ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo) encontraram o maior número de gemas no meio de cultura com  $2,0 \mu\text{M}$  de BAP, em comparação a concentrações que variaram de 0 a  $10 \mu\text{M}$ . Os autores observaram que a taxa de multiplicação sofreu um aumento até a concentração de  $5,1 \mu\text{M}$  de BAP. Da mesma maneira, NEZI et al. (no prelo) observaram que as concentrações de 5,5 e  $4,8 \mu\text{M}$  de BAP são as mais eficientes na proliferação de brotação e de gemas, respectivamente.

Nos trabalhos de NEZI et al. (no prelo), o BAP foi superior ao TDZ em termos de multiplicação de brotos, de gemas e aspecto geral das brotações.

Há ainda a possibilidade de inclusão de auxinas no meio de cultura. KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) encontraram como melhor

combinação entre auxina e citocinina na fase de multiplicação de amoreira as combinações de  $0,5 \times 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,5 \times 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB x BAP no meio de cultura MS. Também em amoreira, RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) testaram o AIA em interação com  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e também com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  da giberelina  $\text{AG}_3$ . O melhor resultado foi  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA combinado com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  e  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

HOEPFNER e NESTBY (1991), no entanto, observaram que não houve multiplicação de *Rubus* quando o nível de auxinas excedeu o nível de citocininas. ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo) encontraram um maior número de gemas de amoreira na ausência de AIB no meio de cultura.

Em se tratando da solidificação do meio de cultura, ZIMMERMAN, BHARDWAJ e FORDHAM (1995) testaram as cultivares Autumn Bliss e Canby de amoreira-vermelha (*Rubus idaeus* L.) e observaram que a proliferação de gemas foi igual ou significativamente melhor no meio de cultura MS solidificado com uma mistura de amido de milho e Gelrite, em relação ao mesmo meio de cultura solidificado com ágar. Segundo os autores, essa mistura de amido-Gelrite é de fácil preparo e o agente gelificante custa somente 10 a 15% do valor do ágar, ou menos ainda se o amido for comprado em grande quantidade. Embora o meio de cultura da mistura amido-Gelrite seja de opaco cinza-branco e apresente a dificuldade de detecção dos contaminantes internos, os contaminantes externos são facilmente distintos. Os autores lembram que o custo dos componentes do meio de cultura de tecidos é ponto importante a ser considerado, tanto por pesquisadores quanto por indústrias.

## 2.7 FASE DE ALONGAMENTO

Esta fase nem sempre acontece na micropropagação. Muitas vezes a espécie em questão já apresenta um alongamento natural durante a fase de multiplicação, podendo ir direto ao enraizamento. A fase de alongamento é, portanto, utilizada em



cultivares que apresentam crescimento muito pequeno em altura na multiplicação. Em amoreira (*Rubus* spp.), muitas cultivares não necessitam de alongamento.

WELANDER (1985), em estudo com amoreira (*Rubus idaeus*), concluiu que o AG<sub>3</sub> contribuiu muito pouco para o alongamento e inibiu o subsequente enraizamento e que os brotos alongaram no meio de cultura de enraizamento, sem a necessidade de colocação num meio de cultura de alongamento.

## 2.8 FASE DE ENRAIZAMENTO

Os brotos desenvolvidos no cultivo *in vitro* geralmente não apresentam raízes. Eles deverão, portanto, passar por uma fase de enraizamento em um meio propício à indução de raízes, preparando as mudas para o transplante do ambiente de cultivo para o ambiente em casa de vegetação e campo (HARTMANN et al., 1997).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por diversos fatores, entre eles os reguladores de crescimento, alguns promovendo, outros inibindo o enraizamento (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). As auxinas compreendem uma grande família de substâncias que têm em comum a capacidade de produzir crescimento celular e também promover a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991). As auxinas têm sido utilizadas na estimulação de raízes adventícias (Quadro 5). Entre elas, o AIB têm sido bastante usado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em uma grande variedade de espécies (HARTMANN et al., 1997).

De acordo com HOEPFNER e NESTBY (1991), muitos métodos de enraizamento de micro-brotos de amoreira têm sido tentados, entre eles, o enraizamento em meios de cultura com composições especiais de reguladores de crescimento. No entanto, KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) conseguiram 87% de enraizamento de amoreira em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. Da mesma maneira, AVITIA GARCÍA e CASTILLO

GONZÁLEZ (1992) obtiveram 77 a 100% de enraizamento em *Rubus* sem a necessidade de adição de reguladores de crescimento para o enraizamento.

HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996) também detectaram uma associação positiva entre as baixas concentrações de reguladores de crescimento e a alta porcentagem de enraizamento de amoreira.

QUADRO 5 - Meios de cultura, substratos e reguladores de crescimento utilizados na fase de enraizamento da micropropagação de amoreira (*Rubus* spp.)

AUTOR	MEIO DE CULTURA E/OU SUBSTRATO	REGULADORES DE CRESCIMENTO
BORGMAN e MUDGE (1986)	AND, meio de cultura de indução de enraizamento, com 1 g.L <sup>-1</sup> Gelrite e após, meio de cultura AND, meio de cultura líquido de enraizamento	1 mg.L <sup>-1</sup> AIB no meio de cultura de indução e 0,5 mg.L <sup>-1</sup> AIB no meio de cultura líquido
JIN, GU e ZHEN (1992)	Substrato perlita:turfa sob nebulização intermitente	Nenhum
AVITIA GARCÍA e CASTILLO GONZÁLEZ (1992)	Enraizamento <i>ex vitro</i> em substrato solo/areia (3/1 v/v), previamente pasteurizada. Os brotos foram cobertos com polietileno e levados à casa de vegetação.	Tratamento da base das estacas com AIB (20, 100 ou 200 mg.L <sup>-1</sup> ) ou Radix-F 1500 (1500 ppm de AIB + 200 ppm de ANA) ou Radix-10.000 (10.000 ppm de AIB + 300 ppm de ANA)
DENG e DONNELLY (1993a)	MS, com 5,5 g.L <sup>-1</sup> de ágar e sem sacarose	2,45 µM AIB
DENG e DONNELLY (1993b)	MS, com 5,5 g.L <sup>-1</sup> de ágar e com sacarose (0, 10, 20 ou 30 g.L <sup>-1</sup> )	2,45 µM AIB
KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993)	MS, líquido com lã de rocha e substrato turfa sob nebulização intermitente	Nenhum

O enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou diretamente em substrato (Quadro 5).

No enraizamento *in vitro* de amoreira (*Rubus idaeus*), WELANDER (1985) e RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) obtiveram resultados positivos com a diluição dos macronutrientes no meio de cultura de enraizamento *in vitro* de *Rubus* sp. Os autores obtiveram 100% de êxito no enraizamento com os macronutrientes do meio de cultura diluídos a 1/5 e com acréscimo de AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>).

DANTAS et al. (2000), da mesma maneira, encontraram o melhor enraizamento de amoreira-preta cv. Caingangue em meio de cultura MS com a diluição de sais a 25%.

A consistência do meio de cultura para enraizamento *in vitro* de amoreira utilizado por BORGMAN e MUDGE (1986) foi sólida durante o período de indução ao enraizamento. Após esse período, as culturas foram transferidas para meio de cultura líquido. KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) conseguiram aumentar de 87% em meio de cultura MS para 92,8% de enraizamento de amoreira em meio de cultura MS líquido com lã de rocha.

O tempo necessário para o enraizamento *in vitro* de amoreira foi de 6 a 8 semanas para BORGMAN e MUDGE (1986). Da mesma maneira KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) deixaram as plantas de amoreira na fase de enraizamento por 6 semanas. Após esse período, as plantas enraizadas foram removidas dos tubos e colocadas em vasos.

Já SOBCZYKIEWICZ (1992) relata que o enraizamento *in vitro* de amoreira foi observado de 10 a 20 dias após o transplante no meio de cultura. Já no enraizamento *ex vitro*, as primeiras raízes apareceram após 2 a 4 semanas.

O enraizamento direto *ex vitro*, por sua vez, possibilita o transplante direto do estágio II (multiplicação) para o enraizamento e aclimação, auxiliando na diminuição das dificuldades técnicas associadas à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* depois do transplante. Assim, os brotos obtidos *in vitro* podem ser tratados como estacas, de tal maneira que se somam as vantagens da propagação *in vitro* e as da propagação convencional. Assim, se ganha tempo e há uma economia de recursos (AVITIA GARCÍA e CASTILLO GONZÁLEZ, 1992).

SOBCZYKIEWICZ (1992) relatou que o enraizamento diretamente em vasos pode auxiliar no processo de aclimação das plantas, já que as raízes não são danificadas. Este é um ponto importante na sobrevivência das plantas. Além disso, HOEPFNER e NESTBY (1991) observam que para tornar a micropropagação de amoreira mais eficiente e reduzir os custos de produção, as micro-estacas deveriam ser enraizadas diretamente em turfa. Um bom procedimento para ambos os clones de

amoreira-vermelha testados pelos autores foi enraizar diretamente as brotações de tamanho grande e médio.

RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) testaram o enraizamento direto de plântulas de amoreira em desenvolvimento, com a imersão por 18 horas em AIB ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e transplante a substrato (solo:areia), e obtiveram a proliferação de raízes e a sobrevivência *ex vitro* de plântulas provenientes de tubos de ensaio. Os autores concluíram que os explantes com maior número de folíolos sobrevivem facilmente.

JIN, GU e ZHEN (1992) também utilizaram o enraizamento direto de amoreira em casa de vegetação, com nebulização intermitente em substrato composto pela mistura perlita/turfa 2/1 (v/v) depois dos explantes terem sido mergulhados em  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB. KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993), no entanto, observaram que os brotos transplantados em solo falharam no enraizamento.

As taxas alcançadas no enraizamento variam de acordo com a cultivar utilizada e o método. SOBCZYKIEWICZ (1992) encontrou uma taxa de enraizamento em amoreira de 73 a 85% e cada planta produziu de 4 a 8 raízes. JIN, GU e ZHEN (1992) obtiveram 100% de enraizamento em casa de vegetação. A maior porcentagem de enraizamento na amoreira obtida por HOEPFNER e NESTBY (1991) foi de 97,4% e houve, segundo os autores, uma correlação positiva entre as altas taxas de enraizamento e o sucessivo vigor das plântulas após enraizamento.

JIN, GU e ZHEN (1992) observaram a formação de raízes aproximadamente 15 dias após a transferência para o enraizamento *ex vitro*.

## 2.9 FASE DE ACLIMATAÇÃO

A aclimação é o processo de transição de plantas cultivadas em ambientes controlados para ambientes em condições naturais. Esse processo deve ser progressivo, de forma que as plantas não sofram estresse que possa levar a danos profundos ou mesmo à morte. O esclarecimento definitivo sobre como e quais fatores morfo-

fisiológicos ou bioquímicos exercem influência na regulação dos mecanismos de tolerância aos estresses, provocando mudanças de ambiente para as plântulas produzidas *in vitro*, contribuirá para a melhor aplicação tecnológica do processo de micropropagação em diversas espécies (SILVA et al., 1995).

Nesse sentido, diversos autores realizaram pesquisas sobre as particularidades das plantas de *Rubus* spp. cultivadas *in vitro*, analisando a anatomia foliar (DONNELLY, SKELTON e NELLES, 1987), a perda de água pelas folhas (DONNELLY, SKELTON e NELLES, 1987), a absorção de CO<sub>2</sub> (DONNELLY e VIDAVER, 1984b; DONNELLY, VIDAVER e COLBOW, 1984), o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (DONNELLY e VIDAVER, 1984b), a anatomia externa das folhas (DONNELLY, SKELTON e DAUBENY, 1986) e a anatomia interna das folhas (DONNELLY e VIDAVER, 1984a).

BRAINERD e FUCHIGAMI (1982) observaram em estudos com macieira que o funcionamento de abertura e fechamento dos estômatos é alterado nas condições de cultivo *in vitro*, permanecendo quase sempre abertos. Esse fator observado pelos autores leva a um aumento na perda de água por parte das plantas cultivadas, principalmente ao passarem das condições com alta umidade do ambiente *in vitro* para o ambiente de casa de vegetação.

DONNELLY e VIDAVER (1984a) observaram algumas características das plantas de amoreira cultivadas *in vitro*. Entre elas, as folhas *in vitro* foram menores e mais finas, com o clorênquima menos compacto, com alterações em relação às plantas controle. Observaram, também, alterações no número e na distribuição dos estômatos e tricomas. Todos os órgãos foram menores e as plântulas foram deficientes na assimilação de CO<sub>2</sub>. DONNELLY e VIDAVER (1984b) acrescentam também a pobre formação de cera epicuticular e cuticular, menores células paliçádicas, maiores espaços intercelulares, menor frequência estomatal e reduzido número de tricomas em folhas de plantas de amoreira cultivadas *in vitro*.

DONNELLY, SKELTON e NELLES (1987) observaram que os estômatos e folhas de plântulas de amoreira cultivadas *in vitro* estavam abertos, enquanto os das plantas cultivadas em casa de vegetação estavam fechados ou com aberturas menores.

A perda de água em plantas cultivadas *in vitro* ocorreu pelas superfícies adaxial e abaxial das folhas, enquanto as folhas de plantas em casa de vegetação apresentaram perda de água principalmente pela superfície abaxial, apenas.

DENG e DONNELLY (1993a e 1993b) relatam que as plantas cultivadas *in vitro* possuem um único “fenótipo induzido pelo cultivo *in vitro*” (CIP), que inclui características anatômicas e fisiológicas diferentes daquelas de plantas cultivadas em casa de vegetação ou a campo. A CIP é caracterizada por folhas pequenas e finas, brotos pequenos e plântulas com pouca cera epicuticular e cuticular, reduzido tecido de suporte mecânico, maior porcentagem de conteúdo de água, estômatos não funcionais e baixa capacidade autotrófica.

Segundo DENG e DONNELLY (1993b), a CIP explica o estresse da muda transplantada *ex vitro* e a mortalidade, que resulta do pouco controle de perda de água e reduzida capacidade fotossintética. Tradicionalmente, um período de aclimação de várias semanas segue o transplante *ex vitro* de plantas micropropagadas. Durante este tempo, as mudas transplantadas são retiradas da alta umidade e a luz é aos poucos aumentada para os níveis do ambiente.

DONNELLY e VIDAVER (1984b) observaram que as plântulas de *Rubus* cultivadas demonstraram níveis relativamente baixos de assimilação de CO<sub>2</sub>. O conteúdo de pigmentos foi maior em plântulas incubadas a baixas intensidades luminosas (2 a 4 klx). Um mês após o transplante, as folhas das plântulas retidas pela cultura (equivalentes a 30% da área foliar total) contribuíram em menos de 10% da assimilação de CO<sub>2</sub>. A contribuição fotossintética dessas folhas foi pequena ou negativa. As primeiras novas folhas formadas no solo foram transitórias e com capacidade intermediária. Essa formação de folhas transitórias parece refletir tanto a influência das condições *in vitro* nos primórdios foliares formados ainda *in vitro*, como também a influência do novo ambiente. Portanto, os autores sugerem que as mudas transplantadas devem passar por um período de aclimação, mais especificamente, um período de desenvolvimento transitivo, no qual tanto as características anatômicas como a performance fisiológica escapem da influência das condições de cultivo *in vitro*.

DONNELLY e VIDAVER (1984b) observam que a amoreira (*Rubus idaeus*) *in vitro* tem uma mínima capacidade de metabolismo autotrófico. No entanto, comparando com outras espécies, SILVA et al. (1995) observaram que esta espécie é rústica e de fácil aclimação.

SILVA et al. (1995) realizaram uma pré-aclimação por um período de 48 horas, com as plântulas de amoreira dentro de tubos destampados, ainda com meio de cultura, em sala arejada e sombreada com temperatura ambiente de 20 a 22°C. As plântulas pré-aclimatadas foram retiradas dos tubos, lavadas em água corrente e transplantadas em substrato orgânico e levadas imediatamente para a casa de vegetação à meia sombra, com nebulização intermitente e ventilação forçada. Os autores chegaram à conclusão, em ensaios de aclimação de plantas, que os substratos não influenciam a sobrevivência das plântulas da cultura de tecidos durante a aclimação. O número de folhas não varia significativamente em nenhuma das espécies, porém a área foliar depende da espécie e da idade de enraizamento, pois a espécie que melhor se aclimatou não foi a de melhor desenvolvimento foliar.

JIN, GU e ZHEN (1992), três semanas após enraizamento em casa de vegetação, removeram as plântulas de amoreira para vasos cobertos com vidros por 7 a 10 dias, para manter a alta umidade. Após o período de crescimento (2 a 3 meses) em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para o campo.

KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) deixaram os vasos por 15 dias em casa de vegetação com nebulização intermitente e na sombra. Após esse período, as plantas de *Rubus* foram transferidas para o campo.

DENG e DONNELLY (1993b) lembram que realizar todo o processo de aclimação *ex vitro* tem altos custos e demanda tempo. Portanto, sugerem mudanças no ambiente da cultura, especialmente nos estádios finais de micropropagação, que possam promover o endurecimento *in vitro*. Modificando a CIP para promover a capacidade fotossintética ou melhorar as relações hídricas, reduz-se ou elimina-se o período de aclimação *ex vitro*. Os autores advertem que a sacarose no meio de cultura, por exemplo, estimula o crescimento de plântulas cultivadas, mas com as taxas comumente usadas (3%) ou maiores ela reduz a fotossíntese e resulta em mixotrofia.

Os autores, ao pesquisarem a aclimação de amoreira, chegaram à conclusão que o enriquecimento do CO<sub>2</sub> *in vitro* aumentou a abertura dos estômatos das folhas das plântulas. No entanto, não houve um aumento do estresse hídrico no transplante (provavelmente devido a um aumento no desenvolvimento de raízes nesse tratamento). Observou-se, também, que uma redução da umidade relativa *in vitro* não afetou o crescimento de plântulas, mas propiciou o decréscimo na abertura dos estômatos e no índice estomatal nas folhas de plântulas cultivadas e promoveu a sobrevivência e o crescimento rápido das mudas transplantadas. Diferentes níveis de CO<sub>2</sub> *in vitro* ou diferentes níveis de umidade relativa não afetaram a taxa fotossintética, nem das plântulas nem das mudas transplantadas. O enriquecimento de CO<sub>2</sub> atuou sinergisticamente com a redução da umidade relativa no aumento do crescimento de plântulas, tanto *in vitro*, quanto *ex vitro*. As plântulas de amoreira-vermelha obtidas a partir do enriquecimento de CO<sub>2</sub> e redução da umidade relativa sobreviveram ao transplante direto nas condições ambientais de casa de vegetação, sem a necessidade de um tratamento especializado de aclimação *ex vitro*.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL E PERÍODO**

Os estudos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal e na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Os experimentos tiveram início em março de 2000 e término em julho de 2001.

#### **3.2 FONTE E TIPOS DE EXPLANTES**

As mudas de amoreira-preta da cultivar Brazos foram obtidas de produtores de São José dos Pinhais, Paraná. Cerca de 70 mudas foram plantadas, em sacos plásticos de 10 L, na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, dando origem às plantas matrizes (Figura 1). As plantas matrizes foram tutoradas com estacas de madeira e pulverizadas a cada 15 dias, no início do crescimento das brotações, com benomil ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). Para controle de ácaros aplicou-se aldicarb no substrato dos sacos. A irrigação foi realizada diretamente no substrato com mangueira. Os botões florais foram retirados para evitar o florescimento e frutificação.

Os explantes foram retirados das brotações novas e consistiram em segmentos nodais ou ápices meristemáticos (Figura 1), dependendo do experimento.



FIGURA 1 - Amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos. *Em cima à esquerda*: plantas matrizes na casa de vegetação. *Em cima à direita*: segmento nodal. *Embaixo à esquerda*: subdivisão dos brotos desenvolvidos que podem ser individualizados em micro-estacas. *Embaixo à direita*: ápice meristemático.

### 3.3 MEIO DE CULTURA E FRASCOS DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos, com exceção de um realizado na fase de multiplicação, foi constituído pelos sais e vitaminas do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). As vitaminas do meio MS são as seguintes: ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e glicina ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O meio de cultura foi acrescido de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de mio-inositol,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar da marca Micromed®.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e da autoclavagem, utilizando algumas gotas de hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N. A água utilizada para o preparo dos meios de cultura foi deionizada.

Os recipientes utilizados foram de dois tipos. Os chamados frascos, com 30 a 39 mm de diâmetro e 74 mm de altura, que receberam 10 mL de meio de cultura e os chamados potes, com 67 mm de diâmetro e 87 mm de altura, que receberam 30 mL de meio de cultura. Todos os frascos foram fechados com papel alumínio e esterilizados em autoclave por 20 minutos com temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  e pressão de 1,5 atm.

Os reguladores de crescimento ZEA e 2iP, que são termolábeis, foram esterilizados pela filtração com membranas de éster de celulose da marca Millipore®, com poros de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro e adicionados ao meio de cultura depois da autoclavagem, antes da solidificação.

Todos os isolamentos e repicagens do material vegetal foram realizados em câmara de fluxo laminar. No isolamento de ápices meristemáticos foi utilizado o microscópio estereoscópico.

### 3.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A sala de cultivo, onde foram mantidos todos os frascos dos experimentos, foi climatizada com um sistema automático para controle de temperatura, umidade e fotoperíodo. Manteve-se a temperatura em  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , a umidade relativa do ar em 65% e o fotoperíodo foi de 16 horas. A iluminação foi obtida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, que forneciam aproximadamente  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Para evitar o aquecimento dos frascos devido à iluminação da prateleira inferior, estes foram colocados sobre placas de isopor, cobertas com plástico transparente.

A fase final do experimento de aclimação e o experimento de enraizamento *ex vitro* foram conduzidos em casa de vegetação.

### 3.5 EXPERIMENTOS NA FASE DE CULTIVO INICIAL

#### 3.5.1 Experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais

No experimento de assepsia foram testados diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com concentração de 0,5% (v/v). O meio de cultura utilizado foi o MS (conforme descrito no item 3.3) acrescido de BAP na concentração de  $5 \mu\text{M}$ .

Os explantes utilizados foram segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, provenientes de ramos novos de amoreiras, retirados no fim do outono, em 03/06/2000. Inicialmente, os ramos coletados sofreram imersão em solução de etanol a 70% (v/v) mais Tween 20 a 0,1% (agente surfactante) por 30 segundos. Em seguida, passaram para a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por diferentes tempos, resultando nos seguintes tratamentos: 0, 10, 20 e 30 minutos de imersão. Em seguida, as brotações foram levadas à câmara de fluxo

laminar onde foram feitas três lavagens em água deionizada estéril. Após o isolamento dos segmentos nodais, individualmente, em frascos pequenos (item 3.3), estes foram colocados em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4.

O esquema experimental foi de uma só variável independente (diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 0,5%), com delineamento inteiramente ao acaso, com 4 tratamentos, 4 repetições e 15 explantes em cada parcela (1 explante em cada frasco). Foi utilizado um total de 60 explantes por tratamento e 240 explantes no experimento.

Após 60 dias, realizou-se a avaliação do experimento pela porcentagem de explantes contaminados por fungos e bactérias.

### 3.5.2 Experimento de controle da oxidação no cultivo de meristemas

Em testes preliminares observou-se uma alta incidência de oxidação quando o explante utilizado foi o ápice meristemático. Já no caso de utilização de segmentos nodais, a oxidação ocorreu em níveis muito baixos. Portanto, no isolamento de ápices meristemáticos, mostrou-se necessária a prevenção da oxidação dos explantes. Em outros testes preliminares testaram-se diferentes concentrações de PVP (polivinilpirrolidona K 25, peso molecular 24.000) adicionado à solução nutritiva antes da autoclavagem do meio de cultura. No entanto, mesmo a mais alta concentração de PVP (0,4 g.L<sup>-1</sup>) mostrou elevados índices de oxidação (em torno de 50%).

Portanto, iniciou-se o presente experimento com doses mais elevadas de PVP. Utilizou-se o meio de cultura MS (item 3.3) acrescido de 5 µM de BAP e diferentes concentrações de PVP (0, 1 e 2 g.L<sup>-1</sup>). Os explantes utilizados foram ápices meristemáticos de 0,2 a 0,8 mm de comprimento, com aproximadamente dois primórdios foliares, provenientes de gemas apicais e axilares de ramos novos de amoreiras em crescimento, retirados no verão, em 06/02/2001. A assepsia realizada foi imersão em etanol 70% (v/v) por 30 segundos mais Tween 20 a 0,1% (v/v), seguida de imersão em hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 10 minutos. Logo após, os explantes



foram levados à câmara de fluxo laminar onde foram feitas três lavagens em água deionizada estéril. Após o isolamento, os ápices meristemáticos foram colocados individualmente em frascos (item 3.3) e mantidos em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4.

O esquema experimental foi de uma só variável independente (diferentes concentrações de PVP), com delineamento inteiramente ao acaso, com 3 tratamentos, 4 repetições e 10 explantes em cada parcela (com 1 explante em cada frasco). Foi utilizado um total de 40 explantes por tratamento e 120 explantes em todo o experimento.

Após 55 dias do isolamento, realizou-se a avaliação do experimento pelas seguintes variáveis: porcentagem de explantes oxidados (totalmente necrosados) e porcentagem de explantes contaminados.

### 3.6 EXPERIMENTOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO

#### 3.6.1 Experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas

Numa primeira etapa de multiplicação, estudaram-se diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas em duas concentrações. Utilizou-se o meio de cultura MS, como descrito no item 3.3.

Os tratamentos foram os seguintes: sem reguladores de crescimento (testemunha), 5  $\mu$ M de BAP, 10  $\mu$ M de BAP, 5  $\mu$ M de CIN, 10  $\mu$ M de CIN, 5  $\mu$ M de ZEA, 10  $\mu$ M de ZEA, 5  $\mu$ M de 2iP, 10  $\mu$ M de 2iP, 5  $\mu$ M de TDZ e 10  $\mu$ M de TDZ.

Nesta fase utilizaram-se as brotações individualizadas (micro-estacas), provenientes da formação do tipo ‘tufos’ que estavam em meio de cultura MS com 5  $\mu$ M de BAP. Cada uma das micro-estacas tinha de 3 a 7 folhas e altura variando entre 0,5 e 1,5 cm.

Em seguida à repicagem em câmara de fluxo laminar, os potes foram colocados em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4.

Os potes que apresentaram algum tipo de contaminação foram retirados do experimento e as avaliações foram realizadas sem levar em conta os frascos contaminados. Por isso, os números finais avaliados podem ser menores, em alguns casos, dos abaixo descritos e serão indicados nas tabelas dos resultados apresentadas no item 4.2.1.

O esquema experimental foi de uma só variável independente (diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas na concentração de 5 ou 10  $\mu\text{M}$ , mais testemunha), com delineamento inteiramente ao acaso, com 11 tratamentos, 4 repetições e 12 micro-estacas por parcela (4 potes em cada parcela, com 3 micro-estacas em cada pote), totalizando 48 micro-estacas por tratamento e 528 micro-estacas no total.

Após quatro semanas realizou-se a avaliação do experimento por três variáveis. A primeira variável foi o número de brotos desenvolvidos que podiam ser individualizados em micro-estacas (Figura 1). Nessa variável, a própria micro-estaca inicial foi contada. Portanto, quando o valor for igual a 1, significa que não houve nenhuma brotação. Consideraram-se como brotos aqueles com no mínimo 0,3 cm de altura e com pelo menos 1 folha. A variável número de brotos por micro-estaca representa a taxa de multiplicação alcançada no período de quatro semanas, pois representa quantos novos brotos a micro-estaca inicial originou durante o período de subcultivo.

A segunda variável analisada foi a altura dos brotos (medida da base do broto até o topo da folha mais alta) em centímetros. E a terceira variável avaliada foi o número de folhas por broto.

Na fase de multiplicação o interesse maior é a obtenção de uma alta taxa de multiplicação, mantendo a qualidade e a fidelidade genética dos brotos produzidos. A taxa de multiplicação é representada pelo número de brotos por micro-estaca e, portanto, essa foi a variável mais importante analisada neste trabalho.

Esse experimento foi subcultivado por mais três vezes sucessivas, totalizando quatro subcultivos. As avaliações de um subcultivo e o início de um novo subcultivo se deram a cada 4 semanas. Após a avaliação de um subcultivo, os brotos obtidos em um tratamento eram utilizados para o início de um novo subcultivo, no mesmo tratamento. Todos os subcultivos foram conduzidos da mesma maneira como acima está descrito, com exceção dos três últimos subcultivos, nos quais os dois tratamentos com TDZ foram excluídos, totalizando, portanto, 9 tratamentos.

### 3.6.2 Experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura

Numa segunda etapa de multiplicação estudaram-se sais minerais de diferentes meios de cultura. Utilizaram-se as vitaminas e o mio-inositol do meio de cultura MS, de acordo com o exposto no item 3.3, padronizadas em todos os tratamentos. Todos os meios de cultura foram acrescidos de 5  $\mu$ M de BAP.

Os tratamentos foram os sais minerais dos seguintes meios de cultura: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS/2 (MURASHIGE e SKOOG, 1962, com a concentração de sais dividida pela metade), WPM (LLOYD e McCOWN, 1986), QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) e AND (Anderson, 1980). A composição química dos meios de cultura está descrita na Tabela 1.

Nesta fase utilizaram-se as brotações individualizadas (micro-estacas), provenientes da formação do tipo ‘tufos’ que estavam em meio de cultura MS com 5  $\mu$ M de BAP. Cada uma das micro-estacas tinha de 3 a 7 folhas e altura variando entre 0,5 e 1,5 cm.

Em seguida à repicagem, em câmara de fluxo laminar, os potes foram colocados em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4.

Os potes que apresentaram algum tipo de contaminação foram retirados do experimento, e as avaliações foram realizadas sem levar em conta os frascos contaminados. Por isso, os números finais avaliados podem ser menores, em alguns



casos, dos abaixo descritos e serão indicados nas tabelas dos resultados apresentadas no item 4.2.2.

TABELA 1 - Concentrações dos sais minerais dos meios de cultura utilizados no experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA (mg.L <sup>-1</sup> )					
COMPONENTES	MS <sup>(1)</sup>	MS/2 <sup>(2)</sup>	WPM <sup>(3)</sup>	QL <sup>(4)</sup>	AND <sup>(5)</sup>
MACRONUTRIENTES					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	825,00	400,00	400,00	400,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00	950,00		1800,00	480,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00	220,00	96,00		440,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00	185,00	370,00	360,00	370,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	85,00	170,00	270,00	
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,30	18,65	37,30	37,30	74,50
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	13,90	27,80	27,80	55,70
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O			556,00	1200,00	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			990,00		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O					380,00
MICRONUTRIENTES					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3,10	6,20	6,20	6,20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	11,15			
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O			22,30	0,758	16,90
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	4,30	8,60	8,60	8,60
KI	0,83	0,42		0,083	0,30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,13	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,25	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125		0,025	0,025

<sup>(1)</sup> Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

<sup>(2)</sup> Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962) com a concentração de sais reduzida à metade

<sup>(3)</sup> Meio de cultura Woody Plant Medium de LLOYD e McCOWN (1986)

<sup>(4)</sup> Meio de cultura de QUOIRIN e LEPOIVRE (1977)

<sup>(5)</sup> Meio de cultura de ANDERSON (1980)

O esquema experimental foi de uma só variável independente (sais minerais de diferentes meios de cultura), com delineamento inteiramente ao acaso, com 5 tratamentos, 4 repetições e 12 micro-estacas por parcela (4 potes em cada parcela, com 3 explantes em cada pote), totalizando 48 micro-estacas por tratamento e 240 explantes no total.

Após quatro semanas realizou-se a avaliação do experimento pelas três variáveis descritas no experimento anterior.

Esse experimento foi subcultivado por mais duas vezes sucessivas, totalizando três subcultivos. As avaliações de um subcultivo e o início de um novo subcultivo se deram a cada 4 semanas. Após a avaliação de um subcultivo, os brotos obtidos em um tratamento eram utilizados para o início de um novo subcultivo, no mesmo tratamento. Todos os subcultivos foram conduzidos da mesma maneira como acima está descrito.

### 3.7 EXPERIMENTOS NA FASE DE ENRAIZAMENTO

#### 3.7.1 Experimento de enraizamento *in vitro* com ou sem AIB

Numa primeira etapa testou-se o enraizamento *in vitro* com ou sem imersão das micro-estacas em solução 1 mM de AIB.

Utilizou-se o meio de cultura MS/2 (concentração de macro e micro nutrientes divididos à metade, mais vitaminas e mio-inositol de MURASHIGE e SKOOG, 1962), como descrito no item 3.3, sem regulador de crescimento.

Nesta fase utilizaram-se as brotações individualizadas (micro-estacas), provenientes da formação do tipo 'tufos' que estavam em meio de cultura MS com 5  $\mu$ M de BAP. Cada uma das micro-estacas tinha de 3 a 7 folhas e altura variando entre 0,5 e 1,5 cm. Para o tratamento com AIB, a base dos explantes foi imersa por 2 segundos na solução 1 mM.

Em seguida à repicagem em câmara de fluxo laminar, os potes foram colocados em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4.

Os tratamentos foram os seguintes: sem imersão em solução de AIB e com imersão em solução de AIB na concentração de 1 mM.

O esquema experimental foi de uma só variável independente (com ou sem imersão em AIB), com delineamento inteiramente ao acaso, com 2 tratamentos, 4 repetições e 12 micro-estacas por parcela (4 potes em cada parcela, com 3 explantes em cada pote), totalizando 48 micro-estacas por tratamento e 96 micro-estacas no total.

A avaliação foi realizada após 41 dias do início do estudo, pelos seguintes parâmetros: porcentagem de plântulas com enraizamento visível externamente, número de raízes por plântula, comprimento das raízes, altura das plântulas (medida do colo da plântula até a folha mais alta) e número de folhas por plântula.

### 3.7.2 Experimento de enraizamento *ex vitro* com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com diferentes tipos e concentrações de citocininas

Nesta segunda etapa testou-se o enraizamento *ex vitro* das micro-estacas provenientes do experimento de multiplicação descrito no item 3.6.1, com diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas em 2 concentrações.

Nesta fase utilizaram-se as brotações individualizadas (micro-estacas), provenientes da formação do tipo ‘tufos’ do experimento na fase de multiplicação com diferentes citocininas, conforme descrito no item 3.6.1. As micro-estacas tinham altura e número de folhas variável, dependendo do tratamento de origem.

As micro-estacas tiveram a base cortada e foram colocadas em bandejas de isopor com 128 células contendo substrato Plantmax® para enraizamento e aclimação, em câmara de nebulização intermitente, com controle automático de rega de 30 em 30 minutos.

Os tratamentos provenientes da fase de multiplicação foram os seguintes: sem reguladores de crescimento (testemunha), 5  $\mu$ M de BAP, 10  $\mu$ M de BAP, 5  $\mu$ M de CIN, 10  $\mu$ M de CIN, 5  $\mu$ M de ZEA, 10  $\mu$ M de ZEA, 5  $\mu$ M de 2iP e 10  $\mu$ M de 2iP.

O esquema experimental foi de uma só variável independente (diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas na concentração de 5 ou 10  $\mu$ M, mais testemunha), com delineamento inteiramente ao acaso, com 9 tratamentos, 4 repetições, 7 a 12 explantes por parcela (dependendo da disponibilidade do tratamento), somando 31 a 48 explantes por tratamento e totalizando 366 explantes.

A primeira avaliação foi realizada em dois momentos distintos. Após 36 dias realizou-se a avaliação pelas seguintes variáveis: porcentagem de plântulas que sobreviveram e porcentagem de plântulas com enraizamento visível externamente. Após 57 dias do início do experimento observou-se a altura das plântulas (medida do colo da plântula até a última folha) e o número de folhas por plântula.

Após as primeiras avaliações, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos de 1 L, com o substrato solo. Depois de aproximadamente três meses do transplante, realizou-se uma última avaliação do desenvolvimento das plantas. Nesse momento observaram-se: a porcentagem de mudas que sobreviveram, a altura das mudas (medida do colo da planta até a última folha) e o número de folhas por muda.

### 3.8 EXPERIMENTO NA FASE DE ACLIMATAÇÃO

#### 3.8.1 Experimento de aclimação após enraizamento *in vitro*

Nesta fase estudou-se a aclimação das mudas após o enraizamento *in vitro*. Testaram-se dois fatores: a presença ou ausência de sacarose na etapa de enraizamento e o local de aclimação (em câmara de nebulização ou em túnel plástico sem nebulização).

Na fase de enraizamento *in vitro* utilizou-se o meio de cultura MS/2 (concentração de macro e micronutrientes divididos à metade, mais vitaminas e mio-inositol de MURASHIGE e SKOOG, 1962), conforme descrito no item 3.3, sem regulador de crescimento, com e sem 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (dependendo do tratamento).

Nesta fase utilizaram-se as brotações individualizadas (micro-estacas), provenientes das formações do tipo “tufos” que estavam em meio de cultura MS com 5 µM de BAP. Cada uma das micro-estacas tinha de 5 a 7 folhas e altura variando entre 1,0 e 2,5 cm.

Os tratamentos foram os seguintes: enraizamento em meio de cultura com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com aclimação em câmara de nebulização; enraizamento em meio de cultura com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com aclimação em túnel plástico sem nebulização; enraizamento em meio de cultura sem sacarose, com aclimação em câmara de nebulização e enraizamento em meio de cultura sem sacarose, com aclimação em túnel plástico sem nebulização.

Em seguida à repicagem em câmara de fluxo laminar, os potes foram colocados em sala de cultivo com as características especificadas no item 3.4, por um período de 49 dias.

Após a fase de enraizamento *in vitro*, os explantes enraizados foram retirados dos potes com meio de cultura e foram colocados em bandejas de isopor com 128 células contendo substrato Plantmax® para aclimação em câmara de nebulização intermitente, com controle automático de rega de 30 em 30 minutos, ou em túnel plástico sem nebulização, mas com irrigação por aspersão a cada dois dias.

O esquema experimental foi um fatorial (2 x 2), com 2 variáveis independentes (sacarose na fase de enraizamento e local de aclimação), com delineamento inteiramente ao acaso, com 4 tratamentos, 4 repetições e 12 micro-estacas por parcela, totalizando 48 micro-estacas por tratamento e 192 micro-estacas no total.

A avaliação foi realizada após 90 dias do início do estudo (41 dias após o início da fase de aclimação), pelos seguintes parâmetros: porcentagem de plântulas que sobreviveram, altura das plântulas e número de folhas por plântula.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após as avaliações, os resultados foram submetidos à média dentro de cada repetição. Posteriormente, realizou-se o Teste de Bartlet para verificar se as variâncias dos diversos tratamentos eram homogêneas entre si. No caso de não serem homogêneas (somente neste caso), procedeu-se à transformação dos dados em logaritmo de  $x$ . Essa transformação está indicada na tabela onde os dados estão apresentados.

Somente após a confirmação da homogeneidade das variâncias pelo Teste de Bartlet, realizou-se a Análise de Variância para detectar se havia diferença estatisticamente significativa entre as médias dos tratamentos aos níveis de 1 e 5%. Nos casos em que o resultado da Análise de Variância foi significativo, realizou-se o teste de comparação de médias de Tukey, no nível de 5%. Os resultados são apresentados em tabelas, onde as médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si. As médias na coluna que não diferiram significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade realizado na Análise de Variância não estão seguidas por nenhuma letra.

Os testes de Bartlet, as Análises de Variância e os testes de Tukey foram realizados no programa de computador MSTAT.

### 3.10 VISÃO GERAL DA SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS

A sequência dos experimentos realizados pode ser observada na Figura 2.

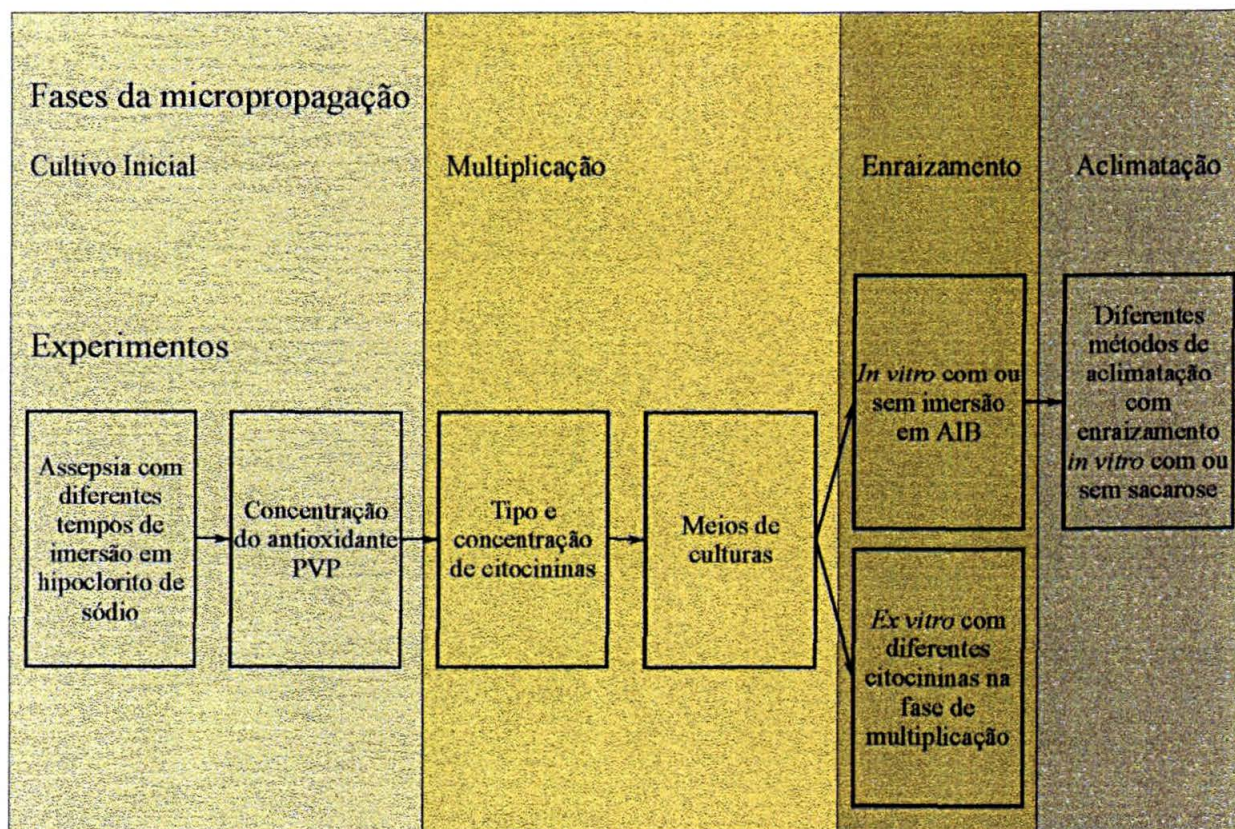


FIGURA 2 - Experimentos realizados no trabalho de micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXPERIMENTOS NA FASE DE CULTIVO INICIAL

#### 4.1.1 Experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais

Testando-se diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio, encontraram-se taxas de contaminação que variaram de 66,7% a 83,3%, sendo de 96,7% na testemunha (Tabela 2).

TABELA 2 - Efeito do tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) sobre a taxa de contaminação de segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	CONTAMINAÇÃO (%)
Sem imersão	60	96,7b <sup>(1)</sup>
10 minutos	60	83,3a
20 minutos	60	78,3a
30 minutos	60	66,7a
Coeficiente de variação (%)		11,78

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As contaminações que ocorreram foram causadas por bactérias e fungos que poderiam estar dentro dos tecidos dos explantes e, neste caso, o hipoclorito de sódio e o etanol não teriam ação. Outra possibilidade seria a de que os contaminantes poderiam estar mesmo na superfície dos tecidos e não foram eliminados pela assepsia. Isso pode ocorrer, segundo CASSELS (1991), porque os microorganismos podem



estar alojados em tecidos que contêm muitos pêlos ou superfícies mucilaginosas ou em resíduos de insetos e podem escapar do efeito dos esterilizantes.

Os melhores tratamentos encontrados foram os com tempo de imersão de 10, 20 e 30 minutos, não diferindo estatisticamente entre si, alcançando índices de 66,7% a 83,3% de contaminação.

Esses resultados estão dentro do esperado, de acordo com McPHEETERS<sup>5</sup>, citado por McPHEETERS, SKIRVIN e HALL (1988), nos quais o melhor tratamento para desinfecção superficial de gemas axilares foi o hipoclorito de sódio a 0,53%.

Os resultados do presente trabalho se distanciam um pouco dos encontrados por RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) com relação ao tempo ideal de imersão. Os autores observaram que uma imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por apenas cinco minutos proporcionou o melhor resultado para a desinfecção superficial. Talvez o motivo para que tenham chegado a esse resultado tenha sido a realização de um pré-tratamento das estacas em uma solução de benomil (400 mg.L<sup>-1</sup>) e sulfato de estreptomicina (100 mg.L<sup>-1</sup>), que teriam auxiliado no processo de assepsia. Os autores também observaram que concentrações e tempos maiores de hipoclorito de sódio podem ter um efeito fitotóxico e não favorecem o desenvolvimento do explante, o que não foi observado no trabalho aqui apresentado.

Pode-se tentar, também, elevar o tempo de imersão em etanol 70%, pois, segundo GILADI, ALTMAN e GOREN<sup>6</sup>, citados por GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), aumentando o tempo de imersão de 0,5 para 5 minutos, a taxa de desinfecção de culturas de *Citrus sinensis* aumentou de 42% para 65%.

Uma outra alternativa seria aumentar as concentrações de hipoclorito de sódio, pois BIASI, KOLLER e KÄMPF (1994) observaram que as taxas de contaminação foram inversamente proporcionais à concentração do hipoclorito de sódio. Os autores alcançaram menos de 10% de contaminação fúngica na imersão de segmentos nodais de abacateiro em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por 10 minutos.

---

<sup>5</sup> McPHEETERS, K. Stability of 'Thornless Evergreen' blackberry *in vitro* and *ex vitro*. Urbana-Champaign, 1985. PhD Tesis – Univ. Ill.

<sup>6</sup> GILADI, I.; ALTMAN, A; GOREN, R. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Horticulturae*, v. 10, p. 357-362, 1979.

CASSELS (1998) sugere, ainda, para diminuir a contaminação, a utilização de explantes de menor tamanho, com a menor quantidade possível de tecidos. Além disso, monitorar as plantas matrizes, realizando tratamentos constantes contra doenças e fazendo a indexação dos explantes em meios de cultura fúngicos e bacterianos e, por fim, evitar as matrizes muito contaminadas.

De acordo com McPHEETERS, SKIRVIN e HALL (1988), o processo de desinfecção é um dos aspectos mais difíceis na cultura de tecidos de *Rubus*. Em realidade, o número de plantas saudáveis encontradas no presente trabalho não foi muito alto, mas foi suficiente para permitir que muitos explantes passassem para a fase de multiplicação, possibilitando a continuação do processo de cultivo *in vitro*.

Além disso, o melhor tratamento alcançado neste experimento de assepsia, foi utilizado no experimento seguinte, de oxidação, e os explantes deste experimento (ápices meristemáticos) não apresentaram nenhuma contaminação. Apesar de o tratamento de assepsia apresentar altos índices de contaminação para segmentos nodais, ele foi muito eficiente para ápices meristemáticos, levando a uma desinfecção superficial de 100% dos explantes.

#### 4.1.2 Experimento de controle da oxidação no cultivo de meristemas

Neste experimento, os melhores tratamentos encontrados foram os com concentrações de 1 e 2 g.L<sup>-1</sup> de PVP, com taxas de oxidação de apenas 12,5% e 21,7%, respectivamente. Pode-se observar na Tabela 3 que a testemunha teve 56,7% de oxidação. Com a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de PVP e 2 g.L<sup>-1</sup> de PVP, mais de 78% de explantes permaneceram verdes. Por esta observação pode-se concluir a necessidade de adição do PVP ao meio de cultura para o isolamento de ápices meristemáticos.

CARVALHO, PINTO e PASQUAL (1990), contudo, ao testarem diferentes concentrações de PVP no isolamento de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), encontraram, como melhor tratamento, a concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de PVP, comparado às concentrações de 0, 5, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>. Esse valor de 10 g.L<sup>-1</sup> pode ser explicado pela

característica mais lenhosa do eucalipto em relação à amoreira. O resultado encontrado por SIQUEIRA e INQUE (1991), entretanto, foi de que o PVP no meio de cultura na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  não diminuiu a oxidação de explantes de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Da mesma maneira, BIASI et al. (1999) não encontraram efeito antioxidante do PVP no isolamento de caquizeiro, mesmo em concentrações de 10 e  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .

TABELA 3 - Efeito do PVP K 25 no controle da oxidação de ápices meristemáticos no cultivo inicial de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	EXPLANTES CONTAMINADOS (%)	EXPLANTES OXIDADOS (%)
Sem PVP	39	0	56,7b <sup>(1)</sup>
$1 \text{ g.L}^{-1}$ PVP	40	0	12,5a
$2 \text{ g.L}^{-1}$ PVP	38	0	21,7a
Coefficiente de variação (%)		0	35,15

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Não houve contaminação em nenhum dos explantes e, apesar dos baixos níveis de oxidação, a maioria dos explantes não se desenvolveu completamente até a formação de plântula. Os meristemas apenas cresceram e formaram folhas. Isso pode ser explicado pelo tamanho reduzido do ápice meristemático isolado no experimento, pois, segundo SOBCZYKIEWICZ (1992), o tamanho do ápice é um fator crítico no estabelecimento de culturas. Em suas pesquisas, apenas 4,3 a 5,3% dos meristemas isolados com tamanho de 0,2 mm se desenvolveram em plântulas.

## 4.2 EXPERIMENTOS NA FASE DE MULTIPLICAÇÃO

### 4.2.1 Experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas

Neste experimento, testaram-se diferentes tipos de citocininas em duas concentrações. No primeiro subcultivo (Tabela 4), os tratamentos com BAP foram superiores a todos os outros tratamentos em relação à variável número de brotos por micro-estaca (4,4 e 4,3 brotos nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ M, respectivamente), apesar de apresentarem baixo número de folhas por broto e menor altura de brotos. As características gerais dos tratamentos podem ser observadas na Figura 3.

Os tratamentos com BAP propiciaram intensa formação de tufo e pouco alongamento dos entrenós. As folhas eram pequenas e bem verdes, algumas apresentando encarquilhamento. Houve desenvolvimento de brotos axilares e também formação de brotos adventícios. As micro-estacas apresentaram um pouco de formação de calos na base e em algumas folhas que encostavam no meio de cultura (Figura 3).

Os outros tratamentos foram inferiores ao BAP, apresentando apenas 1,1 a 1,9 brotos por micro-estaca (Tabela 4). Com relação ao número de folhas por broto, todos esses tratamentos, com a exceção dos tratamentos com TDZ, obtiveram os maiores números, variando de 6,4 a 8,0 folhas. Isso se explica pelo baixo número de novos brotos formados a partir da micro-estaca inicial e, portanto, as folhas formadas estavam concentradas em apenas um ou poucos brotos (às vezes a própria micro-estaca inicial somente).

A testemunha desenvolveu apenas 1,2 brotos por micro-estaca (Tabela 4) e chegou a apresentar um início de formação de raízes (Figura 3). Essa ocorrência também foi observada por KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993), que encontraram enraizamento no estágio de multiplicação.

TABELA 4 - Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no primeiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTOS POR MICRO-ESTACA <sup>(2)</sup> (nº)	ALTURA DOS BROTOS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
0 (testemunha)	48	1,2bc <sup>(1)</sup>	1,52abc <sup>(1)</sup>	8,0a <sup>(1)</sup>
5 µM de BAP	48	4,4a	0,98d	4,7b
10 µM de BAP	48	4,3a	0,89d	4,5b
5 µM de CIN	48	1,8bc	1,54ab	6,7a
10 µM de CIN	45	1,7bc	1,15bcd	7,0a
5 µM de ZEA	48	1,5bc	1,67a	7,3a
10 µM de ZEA	48	1,7bc	1,57ab	6,4a
5 µM de 2iP	48	1,4bc	0,88d	6,9a
10 µM de 2iP	48	1,1c	1,08cd	8,0a
5 µM de TDZ	45	1,6bc	0,82d	4,0b
10 µM de TDZ	42	1,9b	0,82d	4,6b
Coefficiente de variação (%)		21,04	15,65	10,19

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>(2)</sup> Os dados desta variável foram transformados em logaritmo de x para análise. No entanto, os dados apresentados e o coeficiente de variação respectivo são os originais.

Os tratamentos com CIN (Tabela 4) induziram uma multiplicação pequena (1,8 e 1,7 brotos por micro-estaca nas concentrações de 5 e 10 µM, respectivamente), apresentaram um pouco de encarquilhamento de folhas, mas um maior crescimento dos entrenós em comparação aos tratamentos com BAP (Figura 3).

Na presença da ZEA cada micro-estaca apresentou uma média de 1,5 e 1,7 brotos por micro-estaca (nas concentrações de 5 e 10 µM, respectivamente), tendo ocorrido pouca brotação (Tabela 4). Houve bastante alongamento dos entrenós. Algumas folhas estavam um pouco cloróticas (Figura 3).



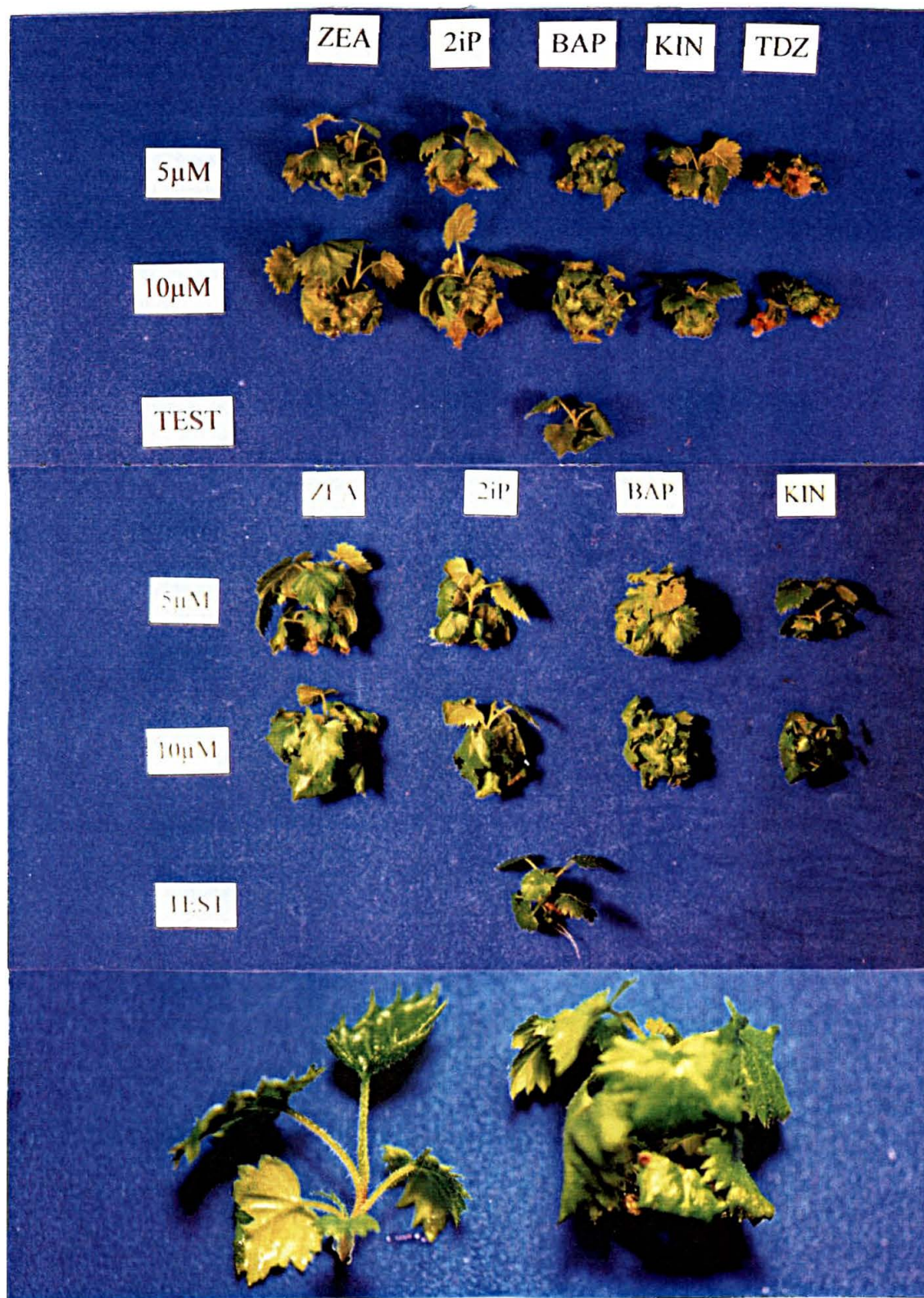


FIGURA 3 - Experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas mostrando o aspecto geral das brotações a partir da micro-estaca inicial. *Em cima*: primeiro subcultivo. *No centro*: segundo subcultivo. *Embaixo*: planta vitrificada (à esquerda) comparada a uma planta normal (à direita).

Com o 2iP, as plantas também se apresentaram levemente cloróticas e com alongamento dos entrenós (Figura 3). As folhas apresentaram grande crescimento, ocorrendo um início de formação de raízes e quase nenhuma multiplicação (1,4 e 1,1 brotos por micro-estaca, nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Observar Tabela 4

Os tratamentos com TDZ apresentaram valores de multiplicação pequenos (1,6 e 1,9 brotos por micro-estacas nas concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Observar Tabela 4. Além disso, nesses tratamentos houve intensa formação de calo, inclusive em cima das folhas. As folhas apresentaram aspecto coriáceo e encarquilhamento. Os pecíolos apresentaram-se alargados e os brotos resultantes estavam deformados, engrossados, bem pequenos, não se mostrando viáveis para serem subcultivados (Figura 3). Como o tratamento com TDZ não se mostrou eficiente nas doses testadas, foi suprimido dos subcultivos seguintes. Os resultados encontrados se assemelham em parte aos encontrados por NEZI et al. (no prelo), em amoreira-preta, nos quais os explantes tratados com TDZ apresentaram brotações de tamanho menor que os tratamentos com BAP. Os autores observaram também que os tratamentos com TDZ tiveram a formação de brotação com os piores aspectos. HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996) também observaram que os tratamentos com TDZ apresentaram grande quantidade de calos nas micro-estacas de amoreira.

Continuando os subcultivos, pode-se observar se os diferentes tratamentos seguirão o mesmo padrão do primeiro subcultivo. Pois o primeiro subcultivo realizado pode, ainda, estar influenciado por um efeito residual do regulador de crescimento que estava presente no meio de cultura da etapa inicial de cultivo, que nesses experimentos foi o BAP a 5  $\mu\text{M}$ . Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), o efeito das citocininas não se restringe a um subcultivo. Diversas vezes se constata um efeito residual de um subcultivo para outro.

Na Tabela 5 observam-se os resultados do segundo subcultivo.

No segundo subcultivo, o BAP continuou mostrando a superioridade na taxa de multiplicação (Tabela 5) nas duas concentrações testadas (6,1 na concentração de 5  $\mu\text{M}$  e 4,7 na concentração de 10  $\mu\text{M}$ ).

TABELA 5 - Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no segundo subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n°)	NÚMERO DE BROTOS POR MICRO-ESTACA ( <sup>2</sup> ) (n°)	ALTURA DOS BROTOS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (n°)
0 (testemunha)	48	1,1e <sup>(1)</sup>	2,16abc <sup>(1)</sup>	8,6abc <sup>(1)</sup>
5 µM de BAP	48	6,1a	1,08e	4,5de
10 µM de BAP	48	4,7a	1,04e	4,3e
5 µM de CIN	48	1,6bc	1,67cd	6,7cd
10 µM de CIN	48	1,9b	1,40de	6,9bc
5 µM de ZEA	47	1,5bcd	2,50a	9,3a
10 µM de ZEA	46	1,3cde	2,46ab	8,9ab
5 µM de 2iP	42	1,0e	1,92bcd	8,0abc
10 µM de 2iP	48	1,2de	1,84cd	7,9abc
Coefficiente de variação (%)		14,56	13,06	12,64

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>(2)</sup> Os dados desta variável foram transformados em logaritmo de x para análise. No entanto, os dados apresentados e o coeficiente de variação respectivo são os originais.

Os outros tratamentos apresentaram taxas que variaram entre 1,0 e 1,9 brotos por micro-estaca (Tabela 5). Similar ao que ocorreu no primeiro subcultivo, as brotações cultivadas na presença de BAP tiveram o menor número de folhas por broto (4,5 e 4,3) e a menor altura dos brotos (1,04 e 1,08 cm). Nos outros tratamentos, alcançaram de 6,7 a 9,3 folhas por broto e alturas de 1,40 a 2,50 cm.

As características das brotações dos tratamentos com BAP permaneceram como descrito no primeiro subcultivo (Figura 3). Além das características anteriormente mencionadas, houve engrossamento de muitos pecíolos, uma leve clorose das folhas e a ocorrência de vitrificação em muitos brotos.

Além dos tratamentos com BAP, o tratamento com ZEA (Figura 3), na concentração de 10 µM, também provocou características de vitrificação. Algumas



folhas estavam bem finas, com as bordas viradas para cima, com aspecto de ‘cozimento’ do tecido vegetal.

A vitrificação ou hiperhidricidade é um distúrbio fisiológico que pode afetar todos os tecidos e órgãos cultivados *in vitro*. Quando ela ocorre, significa que os tecidos passaram por uma mudança no seu processo metabólico, que leva a uma alteração da estrutura e aparência normais. Algumas características podem ser destacadas, como: aspecto vítreo, folhas deformadas e cutícula fina (GEORGE, 1993). HARTMANN et al. (1997) acrescentam a característica de aparência translúcida e suculenta. Segundo os autores, fisiologicamente, a expressão ‘hiperhidricidade’ envolve excesso de absorção de água e inibição da síntese de celulose e lignina. Segundo UENO, CHEPLICK e SHETTY (1998), o resultado prático da vitrificação é a baixa regeneração de brotos.

Embora muitos fatores que induzem a vitrificação tenham sido identificados, ela não é totalmente previsível e HARTMANN et al. (1997) indicam que ela pode ocorrer com maior frequência nos meios de cultura líquidos (ou à baixa concentração de ágar) e com altas concentrações do íon  $\text{NH}_4^+$ .

No entanto, segundo GEORGE (1993), a vitrificação pode estar relacionada ao tipo e à concentração do regulador de crescimento utilizado. A citocinina BAP, por exemplo, tem sido especialmente descrita como causa da hiperhidricidade. KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) encontraram um pouco de vitrificação em *Rubus* nos tratamentos com altas doses de BAP. BIASI, KOLLER e KÄMPF (1994), da mesma maneira, encontraram 63 e 55% de vitrificação nos tratamentos com 4  $\text{mg.L}^{-1}$  de CIN e BAP, respectivamente, em multiplicação de abacateiro.

Uma alternativa utilizada com sucesso por UENO, CHEPLICK e SHETTY (1998) para reduzir a hiperhidricidade *in vitro* foi a inoculação da raça chamada “F” da bactéria *Pseudomonas* sp. em cultivo de *Rubus* sp.

Os resultados no segundo cultivo são os seguintes: a testemunha teve apenas 1,1 broto por micro-estaca (Tabela 5), quase não multiplicou, e apresentou 94% de enraizamento, com folhas bem verdes (Figura 3); esse enraizamento de quase todas as

micro-estacas se deve à ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura, que não inibiram o enraizamento, e à característica da espécie utilizada, que é de fácil enraizamento.

Nos tratamentos com CIN 5  $\mu\text{M}$ , 2iP e ZEA nas duas concentrações, os brotos também enraizaram. GEORGE (1993) relata alguns casos de estimulação do enraizamento por parte de algumas citocininas. No entanto, o autor observa que o mais comum é que as altas concentrações de citocininas (0,5 a 10  $\text{mg.L}^{-1}$ ) inibam ou retardem a formação de raízes.

Os resultados do terceiro subcultivo podem ser observados na Tabela 6.

TABELA 6 - Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no terceiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (nº)	ALTURA DOS BROTO (cm) <sup>(2)</sup>	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
0 (testemunha)	46	1,0e <sup>(1)</sup>	3,53a <sup>(1)</sup>	11,4a <sup>(1)</sup>
5 $\mu\text{M}$ de BAP	43	7,9a	1,28d	3,6d
10 $\mu\text{M}$ de BAP	48	4,8b	1,06d	3,8d
5 $\mu\text{M}$ de CIN	47	1,4d	2,60b	7,7c
10 $\mu\text{M}$ de CIN	48	1,8c	2,04c	7,2c
5 $\mu\text{M}$ de ZEA	48	1,4d	3,88a	9,5b
10 $\mu\text{M}$ de ZEA	48	1,5d	3,50a	8,3bc
5 $\mu\text{M}$ de 2iP	42	1,0e	2,55bc	8,4bc
10 $\mu\text{M}$ de 2iP	46	1,1e	2,50bc	8,3bc
Coeficiente de variação (%)		3,39	12,34	8,62

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>(2)</sup> Os dados desta variável foram transformados em logaritmo de x para análise. No entanto, os dados apresentados e o coeficiente de variação respectivo são os originais.

No terceiro subcultivo pode-se observar, pela Tabela 6, que o tratamento que proporcionou maior número de brotos por micro-estaca foi o BAP na concentração de

5  $\mu\text{M}$ , alcançando 7,9 brotos por micro-estaca. Essa foi a média mais alta de taxa de multiplicação alcançada em todos os subcultivos.

Neste terceiro subcultivo, o tratamento com BAP a 10  $\mu\text{M}$  alcançou a taxa de 4,8 brotos por micro-estaca, sendo o segundo melhor tratamento. As características das brotações nesses dois melhores tratamentos permaneceram as mesmas das descritas nos outros dois subcultivos anteriores, ou seja, folhas pequenas, altura pequena dos brotos (1,28 e 1,06 cm), pecíolos engrossados, brotação adventícia e axilar, com um pouco de calo na base (Figura 4). No entanto, neste terceiro subcultivo não ocorreu a vitrificação em nenhum dos tratamentos.

A maior taxa de multiplicação encontrada para o tratamento BAP 5  $\mu\text{M}$  em relação ao tratamento BAP 10  $\mu\text{M}$  pode ser entendida pela observação de GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) de que, em geral, na fase de multiplicação, as concentrações necessárias de citocininas são menores que as concentrações utilizadas no cultivo inicial, sendo que o excesso delas pode ter um efeito tóxico às brotações.

Os resultados encontrados estão de acordo com ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo). Os autores constataram que a taxa de multiplicação de amoreira-preta sofreu um aumento à medida que se aumentava a concentração de BAP, mas somente até um nível de 5,1  $\mu\text{M}$ .

Os outros tratamentos (Tabela 6) continuaram com baixas taxas de multiplicação (1,0 a 1,8 brotos por micro-estaca), alto número de folhas por broto (7,2 a 11,4) e com as maiores alturas dos brotos (2,04 a 3,88 cm).

O tratamento testemunha, sem reguladores de crescimento (Tabela 6), apresentou alta taxa de enraizamento (Figura 4). Esse tratamento e o tratamento com a ZEA apresentaram os brotos mais altos (3,53 a 3,88 cm).

Os piores tratamentos em relação ao número de brotos por micro-estaca foram a testemunha e as duas concentrações de 2iP, nos quais não ocorreu a multiplicação (Tabela 6).

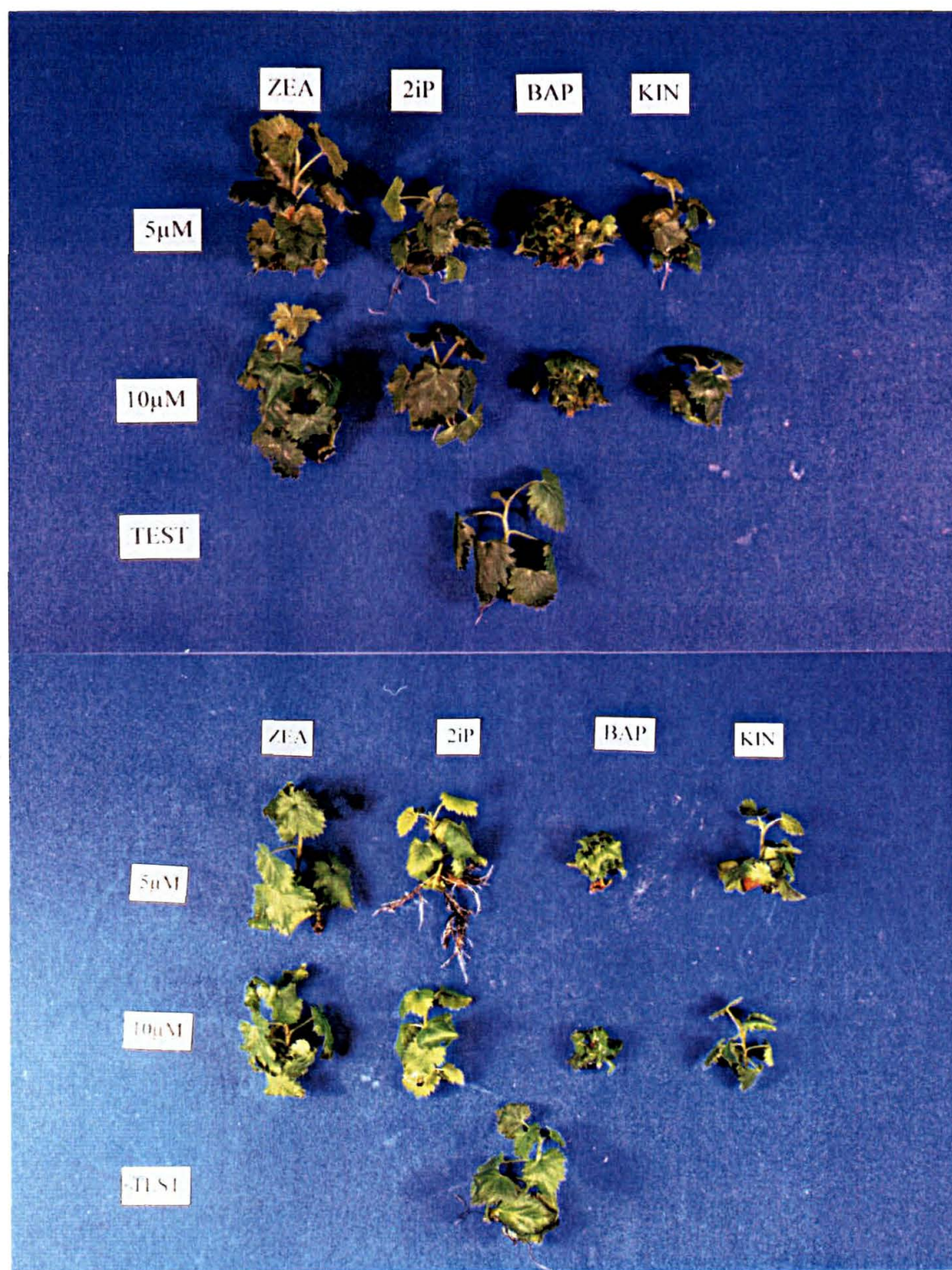


FIGURA 4 - Experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas. *Em cima*: terceiro subcultivo. *Embaixo*: quarto subcultivo.

Com relação ao número de folhas por broto, pode-se observar na Tabela 6 que a testemunha apresentou os melhores resultados, com 11,4 folhas e os piores tratamentos foram os com BAP, com apenas 3,6 e 3,8 folhas por broto.

Ocorreu enraizamento em todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos com BAP. Nos tratamentos com 2iP e ZEA houve formação de calo na base, mas as folhas apresentaram-se normais (Figura 4).

No quarto subcultivo do experimento de multiplicação, as micro-estacas cultivadas na presença de BAP apresentaram a maior taxa de multiplicação comparada às demais (2,6 e 2,1 nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ M, respectivamente). Os outros tratamentos mantiveram as baixas taxas de multiplicação (1,0 a 1,4 brotos por micro-estaca) (Tabela 7).

TABELA 7 - Efeito de tipos e concentrações de citocininas no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no quarto subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTOS POR MICRO-ESTACA (nº)	ALTURA DOS BROTOS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
0 (testemunha)	32	1,0e <sup>(1)</sup>	4,02a <sup>(1)</sup>	8,9a <sup>(1)</sup>
5 $\mu$ M de BAP	42	2,6a	1,09e	6,1e
10 $\mu$ M de BAP	48	2,1b	1,15e	6,2de
5 $\mu$ M de CIN	40	1,1de	3,02c	8,0abc
10 $\mu$ M de CIN	48	1,4cd	2,39d	7,6bc
5 $\mu$ M de ZEA	48	1,4cd	3,79ab	8,5ab
10 $\mu$ M de ZEA	38	1,4c	3,37bc	7,3cd
5 $\mu$ M de 2iP	35	1,0e	3,25bc	8,3abc
10 $\mu$ M de 2iP	45	1,1de	2,89cd	7,7bc
Coefficiente de variação (%)		9,42	8,34	6,50

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pode-se notar, entretanto, um grande decréscimo em relação às taxas alcançadas nos subcultivos anteriores. Isso aconteceu devido à ocorrência, na grande



maioria das micro-estacas, de bactérias pertencentes aos gêneros *Erwinia* e *Pseudomonas*, de acordo com laudo do Laboratório Marcos Enrietti (Anexo 14), provavelmente endofíticas. Estas bactérias estavam localizadas no meio de cultura, próximo à base das micro-estacas e no local onde as folhas encostavam no meio de cultura. A cor era branca escurecida.

O aspecto geral das plantas contaminadas foi de estagnação do crescimento e estagnação do número de folhas por broto na maioria dos tratamentos e diminuição da formação de brotos por micro-estaca. As folhas estavam amareladas e as que encostavam no meio de cultura possuíam cor marrom (Figura 4). As características encontradas se assemelham às descritas por GEORGE (1993). De acordo com o autor, essa contaminação pode ser chamada de contaminação crônica, que ocorre simultaneamente em diversos frascos após um longo período de aparente esterilidade e é difícil de ser detectada antecipadamente. HARTMANN et al. (1997) confirmam que algumas micro-estacas apresentam patógenos internos que permanecem dentro do material vegetal por alguns meses após o cultivo inicial ou isolamento dos explantes.

Provavelmente essas bactérias não são patogênicas, pois as plantas cultivadas em casa de vegetação não apresentavam sintomas de doenças e aparentemente não causaram nenhum tipo de problema ao cultivo *in vitro* enquanto não se manifestaram no meio de cultura. Somente após a manifestação é que se pôde observar a competição entre a micro-estaca e a bactéria pelo espaço e pelos nutrientes do meio de cultura. De acordo com GEORGE (1993), mesmo as bactérias que normalmente não são patogênicas podem interferir no crescimento *in vitro* e levar à morte das plantas em cultivo.

TOLEDO, TORPOCO e ROCA (2001), em pesquisa para eliminação de bactérias endofíticas em coleções de *Ipomoea batata*, encontraram os melhores resultados com antibióticos específicos incluídos no meio de cultura, em relação ao uso de bactericidas, fungicidas ou ao cultivo de meristemas. Após a confirmação da eliminação das bactérias, as plantas foram cultivadas em meio de cultura sem antibiótico, pois os autores advertem que o uso contínuo de antibióticos pode levar à resistência das bactérias. Outra recomendação é a autoclavagem e lavagem do material

exposto à contaminação bacteriana (placas, lâminas de bisturi, entre outros) antes de serem reutilizados ou descartados, para evitar a disseminação das bactérias no meio ambiente.

Pelos motivos acima expostos, os resultados avaliados neste quarto subcultivo, referentes a brotação, crescimento dos brotos e número de folhas por broto, devem estar influenciados pelo surgimento da bactéria, que certamente afetou negativamente a multiplicação e o crescimento das micro-estacas. No entanto, pode-se observar na Tabela 7 a continuidade das tendências verificadas nos três subcultivos anteriores.

Ao analisar os quatro subcultivos, pôde-se observar que houve diferença entre as respostas das diferentes citocininas testadas com relação à multiplicação de amoreira. GEORGE (1993) observa que o efeito das citocininas em cultivo de tecidos e órgãos varia de acordo com o composto específico usado, com o tipo de cultivo, a planta e o tipo do explante.

Pode-se observar, após a apresentação dos resultados, que as micro-estacas tratadas com BAP apresentaram um comportamento nitidamente distinto dos demais. Na presença de BAP ocorreram as maiores multiplicações e em geral os brotos tinham poucas folhas e baixa altura. O inverso ocorreu nos demais tratamentos.

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) indicaram que a maior eficiência do BAP em relação às citocininas CIN e 2iP pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizarem os reguladores de crescimento naturais mais rapidamente do que reguladores de crescimento sintéticos. Segundo os autores, isso pode variar em função da espécie de planta utilizada.

GEORGE (1993) constatou em *Gerbera* que as citocininas ZEA e 2iP podem apresentar inatividade por serem rapidamente degradadas pela ação da enzima natural citocinina oxidase, pela quebra da dupla ligação da cadeia lateral da molécula. Esse fato poderia explicar os baixos índices de multiplicação alcançados nos tratamentos com estas citocininas.

WELANDER (1995), em trabalho de micropropagação de amoreira, também concluiu que o BAP foi superior a outras citocininas (2iP, ZEA e CIN) testadas na multiplicação. KRIKORIAN (1991) comenta que o BAP tem sido mais utilizado

atualmente que as citocininas CIN e ZEA por ser um composto mais ativo, que se encontra facilmente e com custo razoável. O autor completa, ainda, que as adenilcitocininas (ZEA e CIN, por exemplo) somente apresentaram atividade na presença de uma auxina, como o AIA, por exemplo, em pesquisas com cenoura e medula de tabaco. Esse fato pode explicar as baixas taxas de multiplicação alcançadas por estas citocininas. BIASI, KOLLER e KÄMPF (1994), entretanto, encontraram efeitos similares das citocininas BAP e CIN em multiplicação de abacateiro.

HU e WANG<sup>7</sup>, citados por CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA (1998), descrevem a existência de diferenças entre as citocininas. Enquanto o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação, a CIN e o 2iP levam apenas ao crescimento normal sem brotações múltiplas.

Pode-se concluir que os tratamentos com ZEA, CIN e 2iP apresentaram alguma multiplicação no primeiro subcultivo por estarem recebendo ainda alguma influência do BAP no meio de cultura anterior, de onde todas as micro-estacas vieram. No entanto, no 2º, 3º e 4º subcultivos fica bem evidente a superioridade do BAP e a quase não multiplicação dos outros tratamentos.

Uma dúvida que poderia surgir com relação à qualidade das mudas produzidas nos tratamentos com BAP se refere à possibilidade de variação somaclonal. Essa dúvida surge pela constatação da ocorrência de brotação adventícia nas micro-estacas cultivadas com BAP mais intensamente em relação aos tratamentos com outras citocininas, pois, segundo HARTMANN et al. (1997), há uma maior proporção de surgimento de mutações em brotos formados adventiciamente, comparados aos axilares. No entanto, os brotos formados neste trabalho foram visualmente avaliados e não se constatou diferença entre eles.

Apesar do pequeno crescimento dos entrenós das brotações nos tratamentos com BAP, o seu futuro enraizamento e aclimação não foram influenciados, como pode ser observado nos resultados apresentados no experimento do item 4.3.2.

---

<sup>7</sup> HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D. A. et al. *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.



Com relação à altura das brotações, nos quatro subcultivos testados, não se encontrou uma diminuição na altura das brotações ao serem comparadas as duas concentrações da citocinina BAP, diferente do observado por ERIG, ROSSI e FORTES (no prelo), onde, de modo geral, um aumento nas concentrações de BAP no meio de cultura levou a uma diminuição na altura das brotações. No entanto, observando-se as outras citocininas, pôde-se constatar uma pequena diminuição na altura dos brotos formados sob o tratamento na concentração de 10  $\mu\text{M}$  em relação à concentração de 5  $\mu\text{M}$ .

Apresentam-se, a seguir, três figuras comparando os resultados dos quatro subcultivos no experimento de multiplicação com reguladores de crescimento.

Na Figura 5 pode-se observar que os valores de número de brotos por micro-estaca dos tratamentos com BAP tiveram um acréscimo no segundo e terceiro subcultivos.

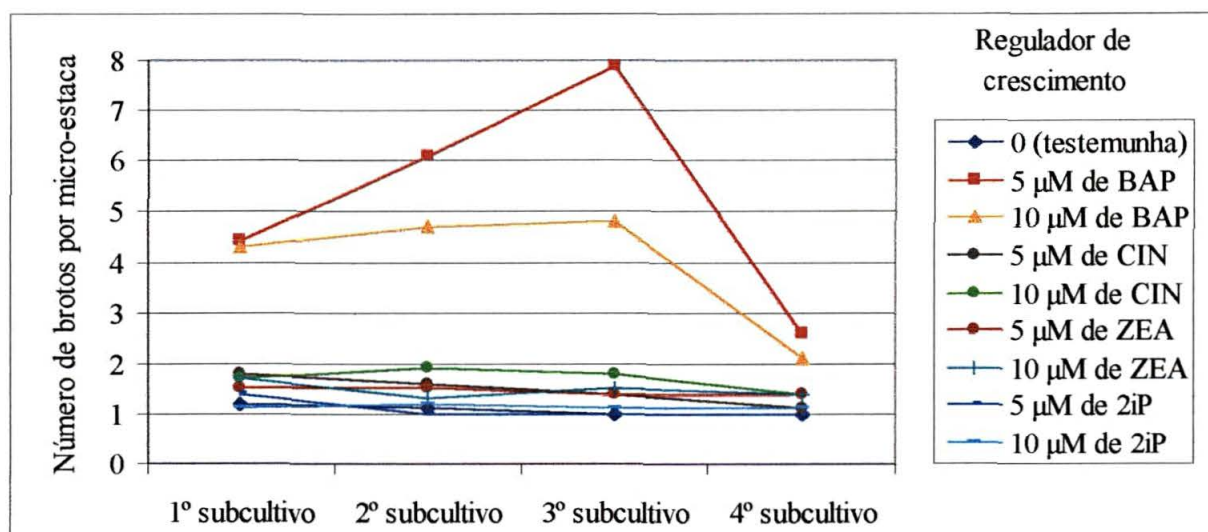


FIGURA 5 - Comparação do número de brotos por micro-estaca em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas

Depois ocorreu um decréscimo no número de brotos por micro-estaca no quarto subcultivo, que se explica pelo surgimento das bactérias. Já os outros tratamentos mantiveram-se aproximadamente constantes ao longo dos quatro

subcultivos, apresentando uma leve queda no último experimento, pelo mesmo motivo da queda dos tratamentos com BAP.

Pode-se observar que, com exceção do BAP, todos os outros tratamentos estiveram com suas taxas de multiplicação variando entre 1 e 2 brotos por micro-estaca, no máximo.

Com relação à altura dos brotos, pode-se observar, na Figura 6, que praticamente todos os tratamentos tenderam ao crescimento na sequência dos subcultivos.

A curva de crescimento foi mais acentuada nos tratamentos que tiveram uma baixa taxa de multiplicação, ou seja, as micro-estacas que não multiplicavam ou que o faziam em uma baixa taxa acabaram quase que somente crescendo. Os tratamentos com BAP, no entanto, por apresentarem maior multiplicação, acabaram não crescendo ao longo dos experimentos, pois cada novo broto dos tratamentos com BAP tinha o tempo de brotação e crescimento de apenas 4 semanas (o intervalo entre subcultivos), enquanto nos outros tratamentos, por não apresentarem multiplicação, os brotos continuavam crescendo, sem a subdivisão.

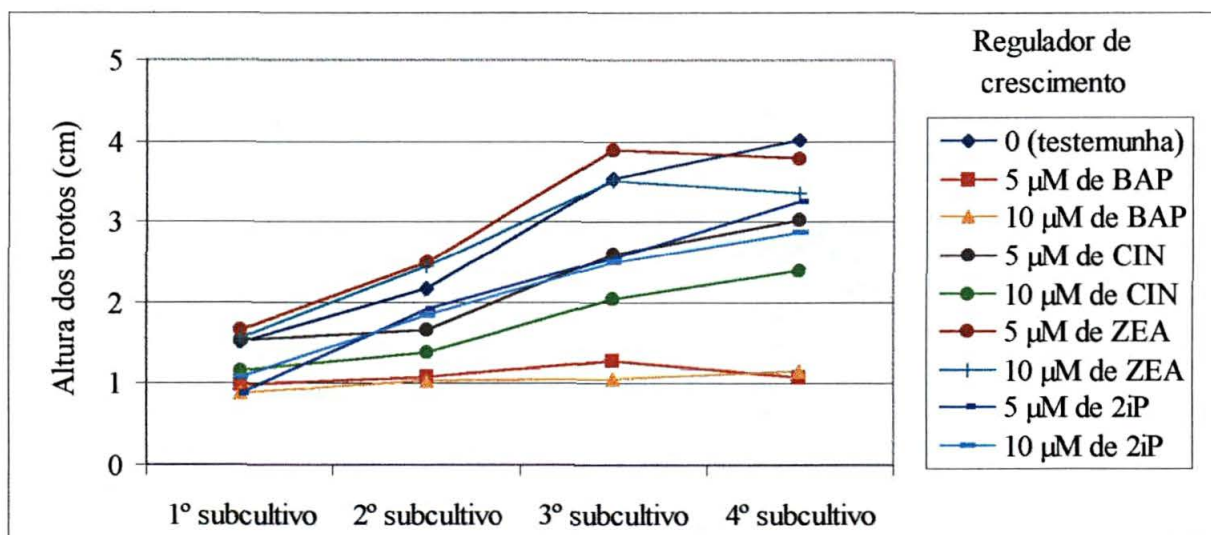


FIGURA 6 - Comparação da altura dos brotos em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas

Observando-se a Figura 7 que compara o número de folhas por broto, observa-se que houve um decréscimo do número de folhas nos tratamentos com BAP até o terceiro experimento e um aumento no quarto experimento e que a tendência foi inversa nos outros tratamentos.

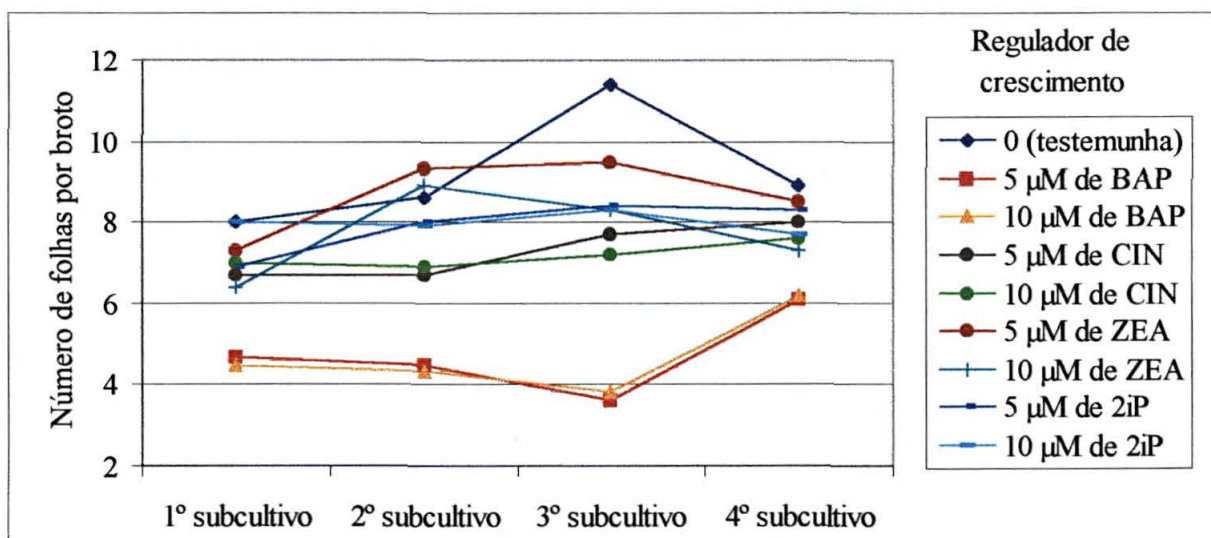


FIGURA 7 - Comparação do número de folhas por broto em cada um dos quatro subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com diferentes tipos e concentrações de citocininas

Ocorreu uma relação inversamente proporcional entre o número de brotos por micro-estaca e o número de folhas por broto. Em cada um dos subcultivos, à medida que a taxa de multiplicação aumentava, o número de folhas por broto diminuía e vice-versa. Além disso, em cada tratamento, especificamente, quando ocorriam altas taxas de multiplicação, o número de folhas foi em geral pequeno e vice-versa.

Com os resultados obtidos com o tratamento 5 µM de BAP pode-se fazer uma projeção teórica da produção de mudas num período de 8 meses. Assumindo a taxa de multiplicação de 4,4; 6,1 e 7,9 brotos por micro-estaca, obtidas no primeiro, segundo e terceiro subcultivo, respectivamente, e mantendo a taxa de 7,9 brotos por micro-estaca, se iniciássemos com apenas 1 micro-estaca, após quatro semanas teríamos 4,4 novas brotações. Após 8 semanas teríamos 26,8 brotos. Após 12 semanas teríamos 212,0

brotos e assim sucessivamente, até que após 8 meses obteríamos 51 milhões de mudas (Tabela 8).

É importante salientar que esses resultados superam em muito o número de mudas que poderia ser obtido no mesmo espaço de tempo por meio da propagação vegetativa tradicional.

TABELA 8 - Projeção do número de mudas que poderiam ser obtidas após 36 semanas de micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos, com a taxa de multiplicação de 4,4; 6,1 e 7,9 brotos por micro-estaca obtidas no 1º, 2º e 3º subcultivos, respectivamente, e mantendo a taxa de 7,9 brotos por micro-estaca a partir do terceiro cultivo

NÚMERO DE SEMANAS	NÚMERO DE MUDAS OBTIDAS A PARTIR DE 1 MICRO-ESTACA INICIAL
0	1
4	4,4
8	26,84
12	212,04
16	1.675,08
20	13.233,17
24	104.542,02
28	825.881,94
32	6.524.467,31
36 (8 meses)	51.543.291,72

#### 4.2.2 Experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura

Da mesma maneira que no experimento anterior, a variável mais importante a ser analisada é o número de brotos por micro-estaca, que revela a taxa de multiplicação alcançada. No primeiro subcultivo do experimento sobre os efeitos dos sais minerais de diferentes meios de cultura na fase de multiplicação, todos os tratamentos, em geral, apresentaram pequeno crescimento dos brotos e folhas um pouco cloróticas.



Pode-se observar, na Tabela 9 que, em relação à variável número de brotos por micro-estaca, os melhores tratamentos foram os meios de cultura MS, MS/2 e AND, com 2,8 a 3,9 brotos por micro-estaca. No entanto, no meio de cultura AND, as brotações apresentaram um baixo número de folhas e baixa altura. HOEPFNER e NESTBY (1991), da mesma maneira, em micropropagação de amoreira, constataram que o meio de cultura AND produziu brotos menores que os do meio de cultura MS.

TABELA 9 - Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no primeiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (nº)	ALTURA DOS BROTO (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
MS	47	3,9a <sup>(1)</sup>	0,71ab <sup>(1)</sup>	5,2a <sup>(1)</sup>
MS/2	47	2,8ab	0,76a	4,9ab
WPM	47	2,6b	0,73a	5,0a
QL	47	2,3b	0,80a	4,8ab
AND	44	3,3ab	0,56b	4,3b
Coefficiente de variação (%)		18,94	10,08	6,23

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O meio de cultura AND pode ter provocado essas características de pequeno crescimento pela falta de nitrogênio e potássio, pois sua composição de íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) é de apenas 25% em relação à composição do meio de cultura MS (GEORGE, 1993). No entanto, o meio AND possui o dobro dos íons fosfato  $\text{PO}_4^{-3}$  e ferro (Tabela 1).

A altura dos brotos esteve entre 0,56 e 0,80 cm nos diversos tratamentos e com 4,3 a 5,2 folhas por broto (Tabela 9).

No meio de cultura WPM pôde-se observar também um avermelhamento dos caules (Figura 8).

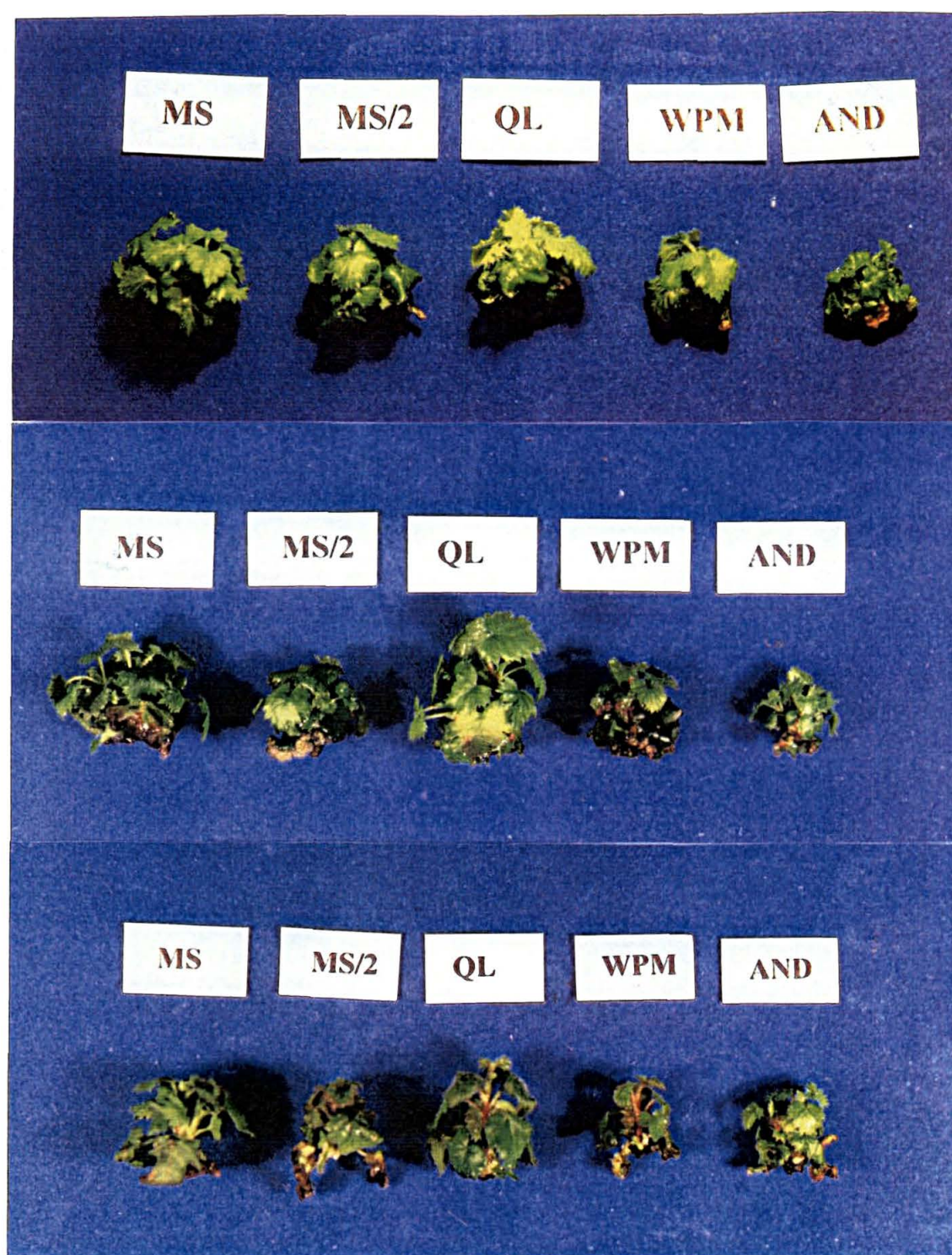


FIGURA 8 - Experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura mostrando o aspecto geral das brotações a partir da micro-estaca inicial. *Em cima*: primeiro subcultivo. *No centro*: segundo subcultivo. *Embaixo*: terceiro subcultivo.

No segundo subcultivo, o meio de cultura que propiciou o maior número de brotos por micro-estaca foi o MS, que alcançou a taxa de 4,3, apesar de ter apresentado o menor número de folhas por broto (Tabela 10).

TABELA 10 - Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no segundo subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (nº)	ALTURA DOS BROTO (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
MS	48	4,3a <sup>(1)</sup>	1,12ab <sup>(1)</sup>	4,8b <sup>(1)</sup>
MS/2	48	2,8b	0,98b	4,9b
WPM	45	1,6c	1,01b	6,2a
QL	48	1,7c	1,35a	6,3a
AND	48	1,9c	0,94b	5,3ab
Coefficiente de variação (%)		14,78	11,09	10,12

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados encontrados se aproximam dos encontrados por TURK, SWARTZ e ZIMMERMAN (1994), nos quais o meio MS proporcionou maior número de brotos regenerados por folha de diversos genótipos de amoreira (*Rubus* spp.), em comparação aos meios AND e WPM.

O segundo melhor tratamento em relação ao número de brotos por micro-estaca foi o MS/2, com 2,8 brotos por micro-estaca (Tabela 10). Observa-se, portanto, que o meio MS com os sais divididos à metade não foi completamente satisfatório para a multiplicação da cultivar testada de amoreira. Os demais tratamentos apresentaram taxa de multiplicação entre 1,6 e 1,9 apenas.

As baixas taxas de multiplicação alcançadas pelas micro-estacas no meio de cultura AND podem ser explicadas pela baixa concentração de nitrogênio e potássio no meio de cultura, como descrito acima, no primeiro subcultivo. A baixa taxa de multiplicação obtida pelas micro-estacas no meio de cultura WPM pode ser explicado

por este meio de cultura ter as mesmas concentrações em íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  que o meio de cultura AND, portanto apenas um quarto da composição do meio de cultura MS. Além disso, o meio de cultura WPM tem menos íons  $\text{Cl}^-$  que o meio de cultura MS. No entanto, o meio de cultura WPM tem mais potássio e íons sulfato que o meio de cultura AND.

As plantas cultivadas nos meios de cultura MS e MS/2 manifestaram sinais leves de vitrificação, o que pode ser explicado pela alta concentração de amônio nesses dois meios de cultura. FORTES (1991) sugere que uma baixa relação C/N pode levar a um aumento da vitrificação dos brotos.

Além disso, nos meio de cultura MS e MS/2, as plantas mostraram poucos sinais de clorose em alguns brotos (Figura 8) e formação de calo na base das micro-estacas, com formação de brotos adventícios e axilares.

Além do acima descrito, as amoreiras no meio de cultura MS exibiram alguns pecíolos engrossados e algumas folhas pequenas.

No meio de cultura MS/2, as folhas que encostavam no meio de cultura estavam com aspecto coriáceo (Figura 8). As plantas apresentaram caules avermelhados, bastantes pêlos e espinhos.

As plantas no meio de cultura WPM eram de tamanho pequeno, apresentando a maioria das folhas bem verdes e firmes, de tamanho pequeno. No entanto, algumas folhas e caules manifestaram avermelhamento (Figura 8).

No meio de cultura WPM e QL as plantas apresentaram início de enraizamento em alguns poucos brotos. E no meio de cultura QL as amoreiras mostraram folhas cloróticas (Figura 8).

As plantas no meio de cultura AND foram muito pequenas, chegando quase a desaparecer no meio de cultura em alguns casos, praticamente ficando só algumas folhas e calo, com aspecto de intensa clorose (Figura 8).

Os resultados encontrados divergem dos encontrados por HOEPFNER e NESTBY (1991), nos quais a multiplicação foi maior no meio de cultura AND em comparação ao meio de cultura MS. Os autores utilizaram outras cultivares, por isso podem ter encontrado resultados distintos.



Em seguida, realizou-se o terceiro subcultivo, cujos resultados podem ser observados na Tabela 11.

TABELA 11 - Efeito de sais minerais de diferentes meios de cultura no número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto no terceiro subcultivo de micro-estacas em multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (nº)	NÚMERO DE BROTOS POR MICRO-ESTACA (2) (nº)	ALTURA DOS BROTOS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO (nº)
MS	48	2,5a <sup>(1)</sup>	1,40a <sup>(1)</sup>	5,6a <sup>(1)</sup>
MS/2	48	1,6ab	0,99c	6,2a
WPM	48	1,3b	1,05bc	6,9a
QL	48	1,5ab	1,34ab	6,8a
AND	48	1,5ab	0,90c	6,4a
Coefficiente de variação (%)		27,41	12,71	14,17

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>(2)</sup> Os dados desta variável foram transformados em logaritmo x para análise. No entanto, os dados apresentados e o coeficiente de variação respectivo são os originais.

No terceiro subcultivo, os melhores tratamentos encontrados foram o MS, MS/2, QL e AND, não diferindo estatisticamente entre si, com taxas de multiplicação que alcançaram de 1,5 a 2,5 brotos por micro-estaca. O meio de cultura WPM (com 1,3 brotos por micro-estaca) foi inferior ao meio de cultura MS. Com relação a número de folhas por broto os tratamentos não diferiram entre si. Os brotos mais altos alcançaram 1,40 e 1,34 cm de altura, respectivamente, pelos tratamentos MS e QL (Tabela 11).

As características gerais observadas nos tratamentos (Figura 8) foram as seguintes: no meio de cultura MS, algumas folhas manifestaram-se bem verdes, outras com características cloróticas; no meio de cultura WPM as plantas mostraram caule avermelhado, com as bordas das folhas avermelhadas.

No terceiro subcultivo ocorreu, como descrito no quarto subcultivo do experimento com reguladores de crescimento (item 4.2.1), o aparecimento de uma bactéria, que certamente afetou o crescimento dos brotos.

Na Figura 9 pode-se observar a sequência dos três subcultivos mostrando as tendências da variável número de brotos por micro-estaca em todos os tratamentos.

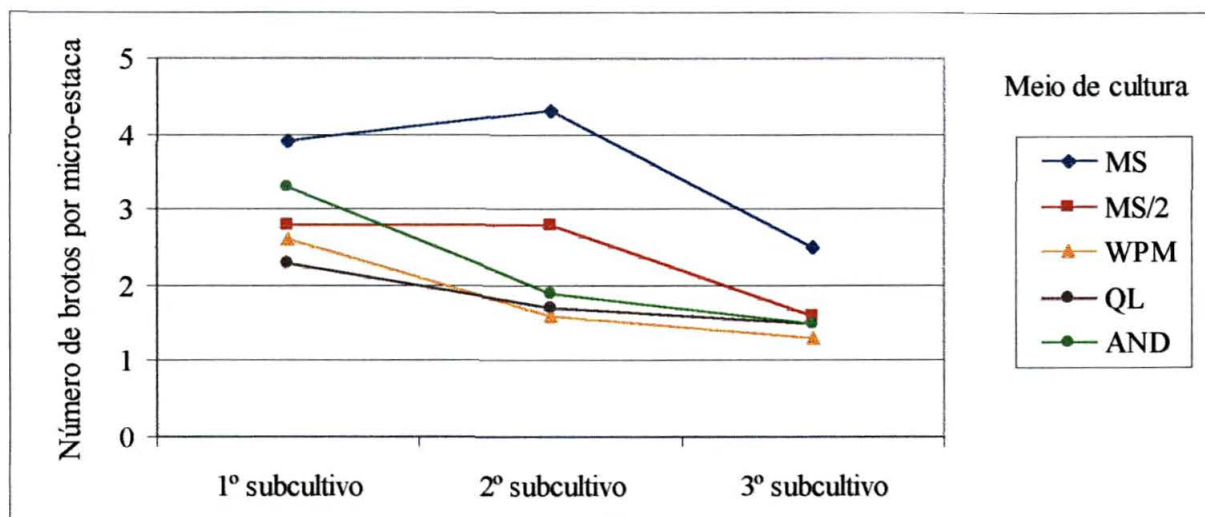


FIGURA 9 - Comparação do número de brotos por micro-estaca em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura

Pode-se observar que, com exceção do meio de cultura MS e MS/2, os demais tratamentos tiveram um declínio na taxa de multiplicação no segundo subcultivo em relação ao primeiro subcultivo. Isso poderia ser explicado pelo fato de esses meios minerais não terem atendido às necessidades nutricionais requeridas pela amoreira-preta, não favorecendo a brotação das micro-estacas.

No terceiro subcultivo o declínio continuou, mas em todos os tratamentos. Neste caso, a explicação se deve ao surgimento da bactéria neste terceiro subcultivo.

Já a altura dos brotos (Figura 10) teve crescimento desde o primeiro subcultivo até o último, em todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos AND e QL.

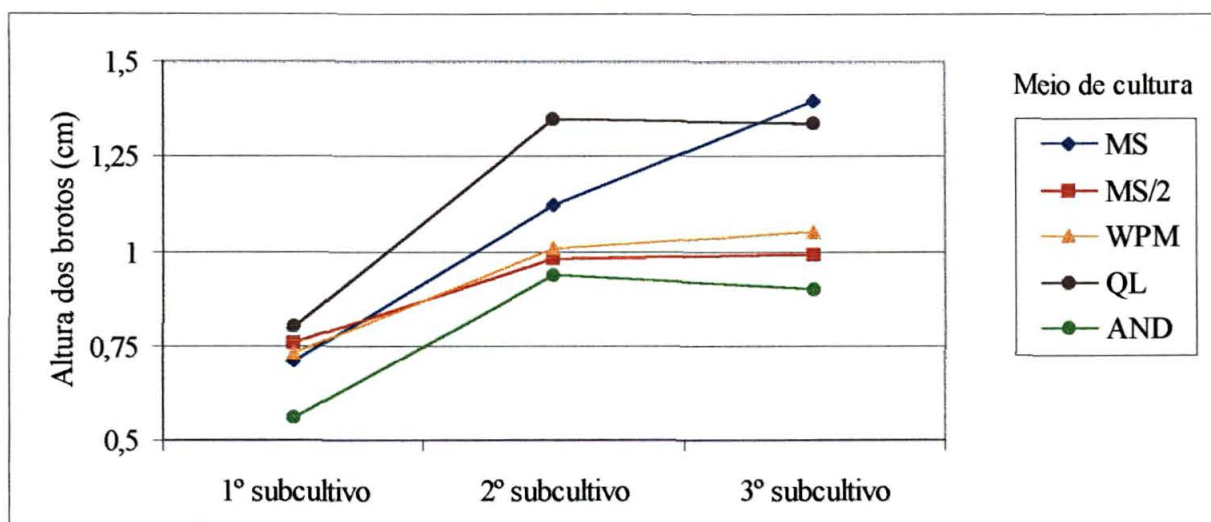


FIGURA 10 - Comparação da altura dos brotos em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura

Com relação à variável número de folhas por broto, observa-se na Figura 11 que os meios de cultura MS e MS/2 tiveram uma diminuição no segundo subcultivo e um aumento no terceiro subcultivo. Os outros tratamentos apresentaram sempre um aumento no número de folhas.

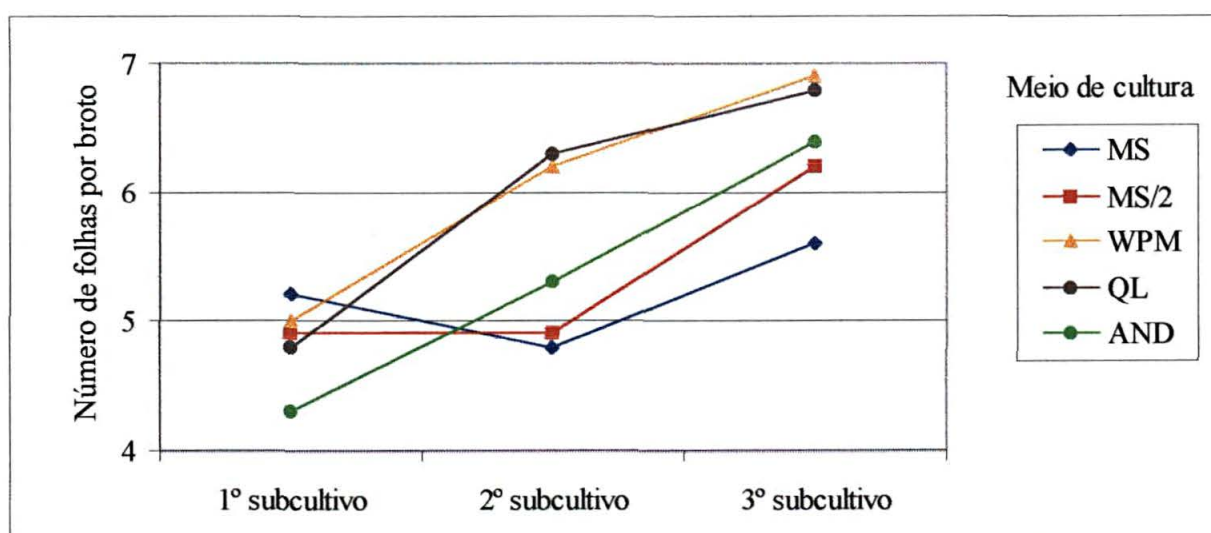


FIGURA 11 - Comparação do número de folhas por broto em cada um dos três subcultivos do experimento de multiplicação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com sais minerais de diferentes meios de cultura

### 4.3 EXPERIMENTOS NA FASE DE ENRAIZAMENTO

#### 4.3.1 Experimento de enraizamento *in vitro* com ou sem AIB

Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - Efeito da imersão ou não em solução 1 mM o AIB na porcentagem de plântulas enraizadas, número de raízes por plântula, comprimento das raízes, altura das plântulas e número de folhas por plântula no enraizamento *in vitro* de micro-estacas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos.

TRATAMENTO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n°)	PLÂNTULAS ENRAIZADAS (%)	NÚMERO DE RAÍZES POR PLÂNTULA (n°)	COMPRI-MENTO DAS RAÍZES (cm)	ALTURA DAS PLÂNTULAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA (n°)
Sem imersão em AIB	48	100,0 <sup>(2)</sup>	3,1b <sup>(1)</sup>	1,78 <sup>(2)</sup>	2,25 <sup>(2)</sup>	9,97 <sup>(2)</sup>
Com imersão em AIB	48	95,8	4,5a	1,53	2,30	9,49
Coefficiente de variação (%)		4,56	11,19	15,82	9,32	4,61

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de T.

<sup>(2)</sup> Médias na coluna não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade, realizado na análise de variância.

Obtiveram-se taxas de enraizamento de 95% (com imersão em AIB) e de 100% (sem imersão em AIB), que não foram estatisticamente diferentes entre si. Com relação ao comprimento de raízes, número de folhas por plântula e altura das plântulas, também não se constatou diferença entre os tratamentos. No entanto, houve apenas diferença com relação ao número de raízes por explante. O tratamento com imersão em AIB apresentou 4,5 raízes, contra 3,1 raízes do tratamento sem imersão em AIB. AVITIA GARCÍA e CASTILLO GONZÁLEZ (1992), no entanto, não encontraram

diferenças entre os tratamentos com AIB e a testemunha, no número de raízes nas cultivares testadas de amoreira.

O aspecto do enraizamento *in vitro* das micro-estacas pode ser observado na Figura 12.

Vários autores descrevem a importância da utilização de auxinas no enraizamento de espécies *in vitro*. O que se pode constatar é que não houve necessidade de imersão em AIB para o enraizamento da cultivar de amoreira-preta testada. Mesmo sem imersão em AIB obteve-se a taxa de 100% de enraizamento dos explantes. Essa ocorrência é provavelmente se deve à facilidade de enraizamento da espécie, e particularmente, da cultivar testada. Segundo ASSIS e TEIXEIRA (1998), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois há bastante variação entre espécies e mesmo entre clones.

Com resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho, AVITIA GARCÍA e CASTILLO GONZÁLEZ (1992) observaram que os reguladores de crescimento não foram necessários para o enraizamento de amoreira. Os autores alcançaram 77 a 100% de sucesso no enraizamento *ex vitro*, dependendo da cultivar. Da mesma maneira, RADMANN, GONÇALVES e FORTES (2000) não observaram diferença significativa na taxa de enraizamento em amoreira-preta cv. Ébano em meio de cultura com diferentes concentrações de AIB, variando entre 0 a 1  $\mu\text{M}$ .

RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA (1990) também observaram que a ausência de reguladores de crescimento ou a concentração muito baixa de auxinas é recomendada para induzir raízes em espécies de *Rubus*. Completando, DANTAS et al. (2000) encontraram o melhor enraizamento da amoreira-preta cv. Caingangue no meio de cultura sem a auxina ANA. HARTMANN et al. (1997) concluem que o tratamento com auxinas deve ser usado somente em espécies de difícil enraizamento. Quando a espécie é de fácil enraizamento, não há justificativa para o gasto adicional com auxinas.



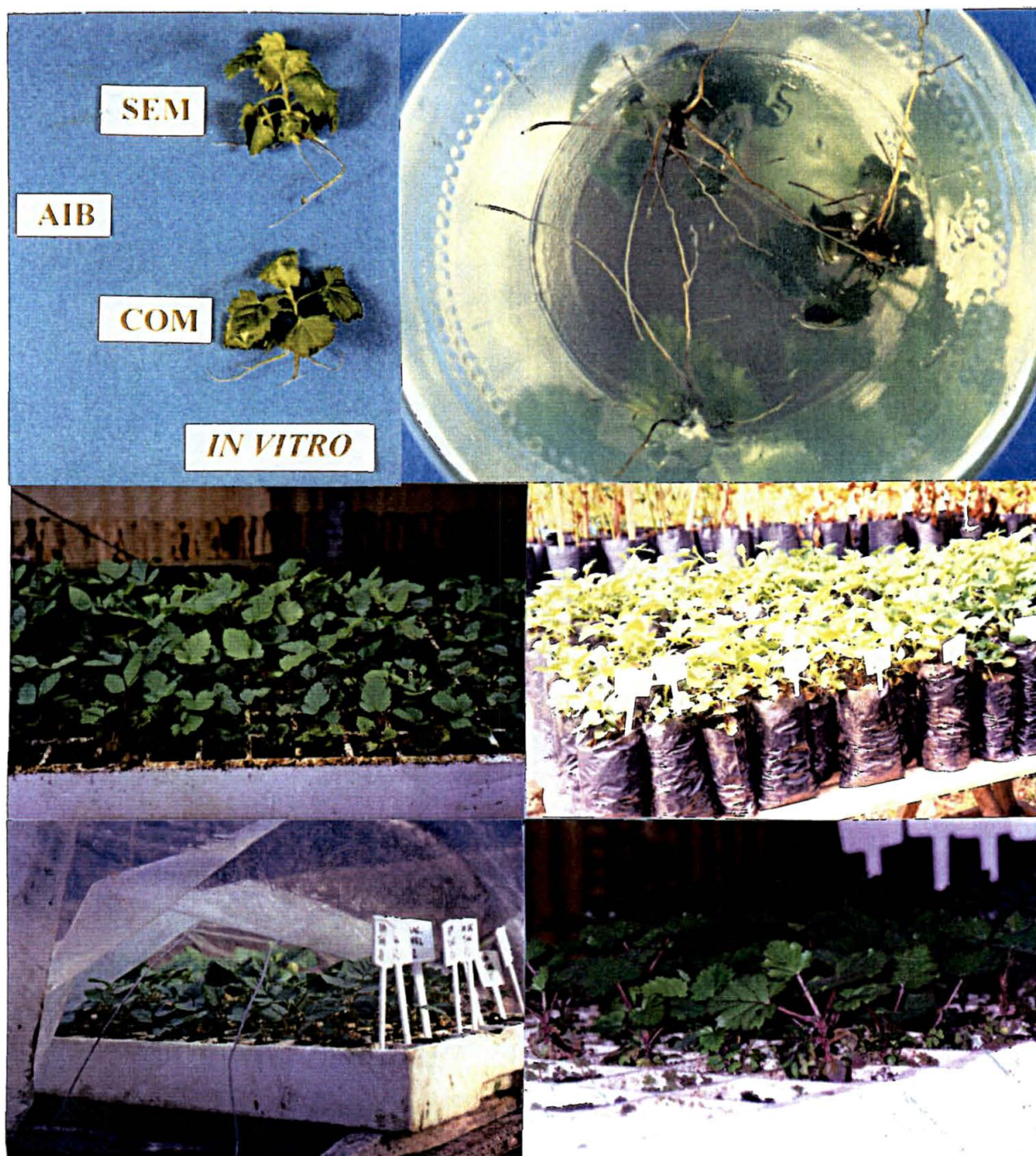


FIGURA 12 - Experimentos de enraizamento e aclimação com amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos. Em cima à esquerda: experimento de enraizamento *in vitro* mostrando plantas do tratamento sem imersão em AIB (em cima) e com imersão em AIB (embaixo). Em cima à direita: aspecto das raízes no vidro do experimento de enraizamento *in vitro*. No centro à esquerda: plântulas na bandeja de isopor sob nebulização intermitente do experimento de enraizamento *ex vitro*. No centro à direita: mudas em sacos plásticos aclimatadas do experimento de enraizamento *ex vitro*. Embaixo à esquerda: plântulas sob túnel plástico do experimento de aclimação. Embaixo à direita: plântulas sob nebulização intermitente do experimento de aclimação.

Alguns autores sugerem que a citocinina BAP no meio de cultura de multiplicação poderia ter efeito residual prejudicial à formação de raízes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). No entanto, pôde-se observar que neste trabalho houve taxa bastante alta de enraizamento o que não indica nenhuma interferência negativa do BAP que estava no meio de cultivo anterior ao enraizamento.

#### 4.3.2 Experimento de enraizamento *ex vitro* com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas

Neste experimento pode-se observar que não houve diferença de sobrevivência e enraizamento entre os diversos tratamentos (Tabela 13).

TABELA 13 - Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas da fase de multiplicação na primeira avaliação da porcentagem de plântulas que sobreviveram, porcentagem de plântulas enraizadas, altura das plântulas e o número de folhas por plântula no enraizamento *ex vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n°)	SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS (%)	PLÂNTULAS ENRAIZADAS (%)	ALTURA DAS PLÂNTULAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA (n°)
0 (testemunha)	31	100,0	100,0	5,88abc <sup>(1)</sup>	11,5ab <sup>(1)</sup>
5 µM de BAP	48	100,0	100,0	5,80abc	10,3ab
10 µM de BAP	48	100,0	100,0	4,16c	8,9b
5 µM de CIN	35	100,0	100,0	5,18bc	9,8b
10 µM de CIN	48	100,0	100,0	5,20bc	9,0b
5 µM de ZEA	48	100,0	100,0	7,22a	14,3a
10 µM de ZEA	36	100,0	100,0	6,10ab	12,2ab
5 µM de 2iP	31	100,0	100,0	5,52abc	11,8ab
10 µM de 2iP	41	100,0	100,0	5,70abc	10,4ab
Coefficiente de variação (%)		0	0	12,92	16,68

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Todos os tratamentos alcançaram taxas de 100,0% de enraizamento e sobrevivência. Mesmo as micro-estacas menores, provenientes dos tratamentos nas duas concentrações de BAP na fase de multiplicação, tiveram uma boa facilidade em enraizar e aclimatar-se (Figura 12).

Diferente do encontrado por HOEPFNER, NESTBY e NYBOM (1996), em que as micro-estacas derivadas do meio de cultura com BAP tiveram uma porcentagem maior de enraizamento do que as derivadas de meio de cultura com TDZ, no presente trabalho a única diferença ocorreu em relação ao número de folhas por plântula e à altura das plântulas, sendo que, em ambas as variáveis, os melhores tratamentos foram a ZEA (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), o 2iP (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), o BAP (5  $\mu\text{M}$ ) e a testemunha.

Essas diferenças constatadas em relação à altura das plântulas e ao número de folhas por plântula entre os tratamentos se explicam porque as micro-estacas vieram com diferentes tamanhos do experimento anterior, conforme apresentado no item 4.2.1. Pode-se observar, no entanto, que numa segunda avaliação todos os tratamentos foram homogêneos e que as diferenças observadas nesta primeira avaliação foram dissipadas na continuação do crescimento das mudas.

Uma ocorrência que se pôde observar em todos os tratamentos foi a formação de algas sobre as plântulas. GEORGE (1993) descreve essa ocorrência como uma das desvantagens da nebulização, que pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias. No entanto, as plântulas foram transplantadas para os sacos plásticos e sofreram nova avaliação, não tendo havido interferência na sobrevivência (Figura 12). Sugerimos, no entanto, quando se observar a formação de algas, que as mudas sejam prontamente tiradas da nebulização se já estiverem enraizadas.

Numa segunda avaliação realizada acompanhou-se o desenvolvimento das mudas após o transplante. Na Tabela 14 pode-se observar as avaliações realizadas.



TABELA 14 - Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas da fase de multiplicação na segunda avaliação da porcentagem de mudas que sobreviveram, altura das mudas e número de folhas por muda no enraizamento *ex vitro* amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n°)	SOBREVIVÊNCIA DAS MUDAS (%)	ALTURA DAS MUDAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR MUDA (n°)
0 (testemunha)	31	100,0	28,83 <sup>(1)</sup>	40,4 <sup>(1)</sup>
5 µM de BAP	48	100,0	34,20	40,4
10 µM de BAP	48	100,0	27,95	36,0
5 µM de CIN	35	100,0	27,13	35,1
10 µM de CIN	48	100,0	38,17	38,7
5 µM de ZEA	48	100,0	34,03	40,4
10 µM de ZEA	36	100,0	34,85	41,7
5 µM de 2iP	31	100,0	35,50	39,4
10 µM de 2iP	41	100,0	33,20	38,8
Coefficiente de variação (%)		0	31,20	12,13

<sup>(1)</sup> Médias na coluna não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade, realizado na análise de variância.

Todos os tratamentos continuaram com 100% de sobrevivência, com crescimento vigoroso e sadio. O número de folhas por muda esteve entre 35,1 e 41,7, não tendo variado estatisticamente entre si. Com relação à altura das mudas, foram alcançadas alturas entre 27,13 a 38,17 cm, também sem variação estatisticamente significativa.

Pode-se concluir que o tipo da citocinina utilizada no meio de cultura na fase de multiplicação não afetou o enraizamento e sobrevivência das mudas e nem o posterior desenvolvimento delas. E pode-se concluir que o enraizamento *ex vitro* pode ser realizado com sucesso para amoreira-preta, reduzindo uma etapa do processo de micropropagação, ao combinar numa só fase o enraizamento e a aclimação, reduzindo o tempo e os custos de todo o processo.

Além da redução dos custos, há outra grande vantagem do enraizamento *ex vitro*. Há uma melhoria na qualidade do sistema radicular formado na planta. Este se

forma mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias, sem a formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

#### 4.4 EXPERIMENTO NA FASE DE ACLIMATAÇÃO

##### 4.4.1 Experimento de aclimação após enraizamento *in vitro*

Podem-se observar os resultados do experimento nas Tabelas 15 e 16. Não se encontrou interação entre os dois fatores testados (meio de cultura de enraizamento e método de aclimação). Analisaram-se, portanto, as médias de cada fator, isoladamente.

Comparando-se os tratamentos relacionados ao meio de cultura no enraizamento, pode-se observar que não houve diferença com relação à sobrevivência, enraizamento e número de folhas por plântula (Tabela 15).

Esses resultados diferem dos encontrados por DENG e DONNELLY (1993a), que observaram que a ausência de sacarose no meio de cultura de enraizamento levou a um aumento na fotossíntese e ao “endurecimento” das plântulas *in vitro*.

TABELA 15 - Efeito da presença ou ausência de sacarose do meio de cultura de enraizamento *in vitro* na porcentagem de plântulas que sobreviveram, altura das plântulas e número de folhas por plântula no experimento de aclimação de plântulas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTO	SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS (%)	ALTURA DAS PLÂNTULAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA (nº)
Com sacarose	100,0	2,91a <sup>(1)</sup>	9,3 <sup>(2)</sup>
Sem sacarose	100,0	2,28b	9,1
Coefficiente de variação (%)	0	10,43	5,23

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de T.

<sup>(2)</sup> Médias na coluna não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade, realizado na análise de variância.

No entanto, com relação à altura das plântulas, o meio de cultura de enraizamento com sacarose foi superior ao meio de cultura sem sacarose (2,91 cm contra 2,28 cm). Esse resultado é similar ao encontrado por DENG e DONNELLY (1993a), no qual o meio de cultura com sacarose levou a um crescimento das plântulas.

Essa ocorrência pode ser explicada pelas características das plântulas *in vitro*, de não estarem tão aptas à realização da fotossíntese. Por essa deficiência, haveria uma menor produção de carboidratos que pode ter sido insuficiente para o processo de respiração celular. Portanto, nos tratamentos em que houve fornecimento de sacarose, as plântulas apresentaram um maior crescimento.

No entanto, pode-se observar que a ausência de sacarose somente levou a uma menor altura das plântulas. Ela não influenciou o número de folhas nem levou a um aumento na taxa de sobrevivência dos explantes, podendo-se supor que a cultivar de amoreira pesquisada *in vitro* não apresenta características totalmente heterotróficas, mesmo com meio de cultura com sacarose, diferente do citado por DONNELLY e VIDAVER (1984b), que constataram que a amoreira *in vitro* tem uma mínima capacidade de metabolismo autotrófico. Ou seja, logo após o transplante, houve sobrevivência de 100,0% das plântulas transplantadas em todos os tratamentos. Se as

condições das plântulas *in vitro* da amoreira fossem de heterotrofia, provavelmente haveria uma grande taxa de morte das mudas, o que não ocorreu.

Pode-se concluir, ainda, para a cultivar testada, que não é necessário modificar as condições de cultivo *in vitro* sugeridas por DENG e DONNELLY (1993b), nem realizar um período de pré-aclimatação sugerido por KARAKULLUKÇU, AGAOGLU e ABAK (1993) e SILVA et al. (1995).

Com relação ao método de aclimatação, não se encontraram diferenças na sobrevivência das plântulas em diferentes métodos de aclimatação. No entanto, o tratamento no túnel plástico levou a um maior crescimento das plântulas (3,04 cm, contra 2,15 cm da câmara de nebulização) (Tabela 16).

TABELA 16 - Efeito do método de aclimatação na porcentagem de plântulas que sobreviveram, altura das plântulas e número de folhas por plântula no experimento de aclimatação de plântulas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

TRATAMENTO	SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS (%)	ALTURA DAS PLÂNTULAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA (nº)
Câmara de nebulização	100,0	2,15b <sup>(1)</sup>	9,7a <sup>(1)</sup>
Túnel plástico sem nebulização	100,0	3,04a	8,7 b
Coeficiente de variação (%)	0	10,43	5,23

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de T.

Com relação ao número de folhas por plântula, a câmara de nebulização levou a um maior número de folhas (9,7 contra 8,7 folhas por plântula no tratamento com túnel plástico).

Pode-se concluir que foi possível aclimatar a amoreira-preta cv. Brazos enraizada sem necessidade de nebulização intermitente. Essa característica de não exigência de câmara de nebulização para aclimatação das mudas pode reduzir os custos em casas de vegetação para o processo de micropropagação, por não haver a necessidade de instalação de equipamentos de nebulização.

De acordo com GEORGE (1993), é necessária uma alta umidade e proteção para os primeiros estágios de aclimação das plantas ao ambiente *ex vitro*. O autor sugere que um mínimo de 85% de umidade relativa do ar seja mantido durante algumas semanas.

Apesar das diferenças encontradas entre os tratamentos com respeito à altura das plântulas e número de folhas por plântula, a variável importante analisada foi a que revela a porcentagem de sobrevivência. Nessa variável não se encontrou nenhuma diferença entre os tratamentos testados, e as taxas alcançadas foram de 100,0% em todos os tratamentos. Isso é bastante importante, pois de acordo com DONNELLY e VIDAVER (1984b), um dos maiores limites à produção comercial de plantas propagadas assepticamente é a baixa sobrevivência de plântulas quando transferidas do meio de cultura ao solo.

#### 4.5 PROTOCOLO PARA MICROPROPAGAÇÃO DE AMOREIRA-PRETA

A partir dos resultados obtidos pode-se elaborar um esquema de protocolo completo para micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos (Figura 13).

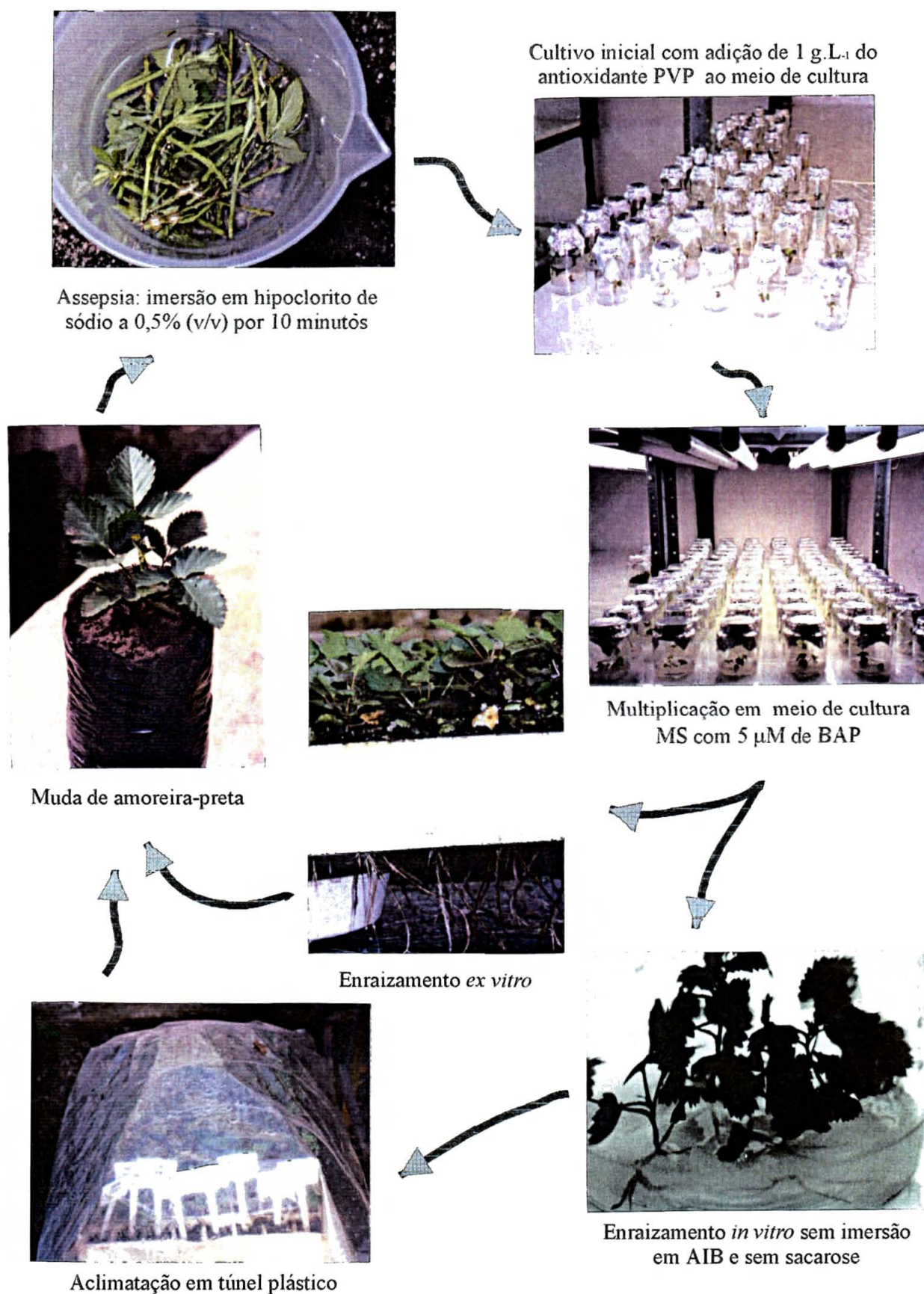


FIGURA 13 - Protocolo de micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos

## 5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que o melhor protocolo alcançado para a micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Brazos é o seguinte:

- 1) assepsia das brotações pela imersão em solução de etanol 70% (v/v) mais Tween 20 a 0,1% por 30 segundos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por 10 minutos;
- 2) cultivo inicial com adição do antioxidante PVP ao meio de cultura na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>;
- 3) multiplicação em meio de cultura MS acrescido da citocinina BAP na concentração de 5µM;
- 4) enraizamento *in vitro* sem a necessidade de imersão das micro-estacas na solução 1 mM de AIB, sem a adição de sacarose ao meio de cultura de enraizamento, com posterior aclimação em casa de vegetação em túnel plástico, sem a necessidade de nebulização ou
- 5) enraizamento *ex vitro* e aclimação em casa de vegetação com nebulização intermitente.

## 6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir algumas pesquisas futuras. Em experimentos de assepsia, buscando reduzir os índices de contaminação de segmentos nodais, sugere-se que se realize um pré-tratamento dos explantes com fungicidas. Outra tentativa seria a pesquisa em relação a outros agentes desinfetantes. Além disso, pode-se tentar a utilização de concentrações maiores que 0,5% de hipoclorito de sódio ou maiores tempos de imersão (acima de 30 minutos). Pois a concentração e o tempo utilizados no presente trabalho aparentemente não chegaram a causar nenhum dano aos explantes.

Havendo possibilidade, pode-se utilizar explantes com menor quantidade de tecido vegetal, tal como gemas e ápices meristemáticos, buscando diminuir a contaminação dos explantes.

Os explantes do experimento de cultivo de meristemas realizado neste trabalho, no entanto, apresentaram pouco desenvolvimento. Portanto, sugere-se que sejam utilizados ápices meristemáticos de tamanho maior que os utilizados no presente trabalho (0,2 a 0,8 mm). Ainda para o cultivo de meristemas sugere-se, para um estímulo ao seu desenvolvimento e crescimento, tentativas de adição de diferentes reguladores de crescimento em diferentes concentrações.

Na fase de multiplicação pode-se sugerir que outras pesquisas sejam realizadas com a citocinina BAP em concentrações menores. Pois constatamos que a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de BAP foi superior à concentração de 10  $\mu\text{M}$  de BAP. É possível que ocorram altas taxas de multiplicação, mesmo em concentrações menores. O objetivo destes testes seria a obtenção de um maior crescimento dos brotos e maior número de folhas por broto, pois, segundo HARTMANN et al. (1997), altas concentrações de citocininas inibem o alongamento dos brotos.



Outra tentativa para suprir a falta de crescimento dos brotos em multiplicação nos tratamentos com BAP seria a utilização conjunta de outros reguladores de crescimento, tais como as giberelinas, visando a um alongamento dos entrenós.

Ainda na fase de multiplicação sugere-se que sejam testadas auxinas combinadas com as citocininas, buscando a promoção da brotação e um aumento na multiplicação das micro-estacas.

Com relação aos tratamentos com BAP, sugere-se que sejam realizados trabalhos na investigação da ocorrência de variação somaclonal nas plântulas obtidas a partir desses tratamentos, pois estas apresentaram bastante brotação adventícia. Além da avaliação fenotípica poderiam ser realizados testes no nível molecular, tais como contagem de cromossomos, técnicas de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e *Randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD).

Neste trabalho observou-se a ocorrência generalizada de bactérias a partir do terceiro e quarto subcultivos dos dois experimentos de multiplicação. Sugere-se, portanto, que sejam realizados mais trabalhos de identificação e de controle da contaminação bacteriana endógena. Sugere-se testar bactericidas e antibióticos no meio de cultura para evitar o crescimento das bactérias, pesquisando tipos e concentrações de antibióticos no meio de cultura, visando equilibrar o controle das bactérias e a possibilidade de fitotoxicidade às plantas.

Diante das altas taxas de sobrevivência alcançadas na aclimação após o enraizamento *in vitro* e pela dificuldade no manuseio do túnel plástico para grande quantidade de mudas, sugere-se que seja experimentada a aclimação diretamente em casa de vegetação, sem proteção ou nebulização. Ou, numa tentativa intermediária, o início da aclimação em túnel plástico e logo em seguida, retirada da proteção.

Com relação ao enraizamento *ex vitro*, o presente trabalho testou-o somente sob nebulização intermitente. Como se realizou um trabalho de aclimação em túnel plástico com plântulas pré-enraizadas *in vitro* e obteve-se 100% de sobrevivência, sugere-se que seja testado o enraizamento direto *ex vitro* em casa de vegetação, mas sob túnel plástico, ao invés da nebulização intermitente, visando diminuir os custos do processo de micropropagação.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W. C. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 112, p. 13-20, 1980.
- ANTUNES, L. E. C.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. de A.; DUARTE FILHO, J. Fenologia e produção de variedades de amora-preta nas condições do planalto de Poços de Caldas – MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 89-95, abr. 2000.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998, v. 1, p. 261-296.
- AVITIA GARCÍA, E.; CASTILLO GONZÁLEZ, A. M. Enraizamento *ex vitro* de cuatro cultivares de zarzamora (*Rubus* spp.). **Revista Chapingo**, v. 16, n. 78, p. 107-109, 1992.
- BIASI, L. A. et al. Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro ‘Fuyu’ por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 279-283, dez. 1999.
- BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KÄMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro ‘Ouro Verde’ a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, jul. 1994.
- BOREJSZA-WYSOCKI, W.; HRAZDIN, G. Establishment of callus and cell suspension cultures of raspberry (*Rubus idaeus* cv. Royalty). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 213-216, 1994.
- BORGMAN, C. A.; MUDGE, K. W. Factors affecting the establishment and maintenance of ‘Titan’ red raspberry root organ cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, p. 127-137, 1986.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO<sub>2</sub>. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 33, n. 134, p. 388-392, jun. 1982.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998, v. 1, p. 87-132.
- CANTONI, L.; BERARDI, G.; ROSATI, P. Callus induction from endosperm culture of blackberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 352, p. 145-149, 1993(a).
- \_\_\_\_\_. Organogenesis and somatic embryogenesis from immature embryos of blackberry. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 352, p. 37-42, 1993(b).

CARRILLO, G.; MENDOZA, J. L. Efecto de productos naturales sobre el desarrollo *in vitro* de yemas de *Rubus* sp. **Turrialba**, v. 29, n. 4, p. 299-303, out.-dez. 1979.

CARVALHO, D. de; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, jan.-abr. 1990.

CASSELLS, A. C. *In vitro* production of pathogen and contaminant-free plants. In: ALTMAN, A. **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 43-56.

CASSELLS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 31-44.

COUSINEAU, J. C.; DONNELLY, D. J. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 27, n. 3, p. 249-255, 1991.

DANTAS, A. C. de M. et al. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caingangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.

DAUBENY, H. A. Brambles. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. **Vine and small fruits**. John Wiley and Sons, 1996. p. 109-190. (Fruit Breeding, vol. II).

DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry by CO<sub>2</sub> enrichment and reduced medium sucrose concentration. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 1048-1051, 1993(a).

\_\_\_\_\_. *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 73, n. 4, p. 1105-1113, out. 1993(b).

DONNELLY, D. J.; SKELTON, F. E.; DAUBENY, H. A. External leaf features of tissue-cultured 'Silvan' blackberry. **Hortscience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 306-308, 1986.

DONNELLY, D. J.; SKELTON, F. E.; NELLES, J. E. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 3, p. 566-569, 1987.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Physiological and anatomical transitions in tissue cultured raspberry. **Plant Physiology Supplement**, Washington, v. 75, n. 1, p. 13, may, 1984(a).

\_\_\_\_\_. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 177-181, 1984(b).

- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; COLBOW, K. Fixation of  $^{14}\text{CO}_2$  in tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 313-317, 1984.
- ERIG, A. C.; ROSSI, A. de; FORTES, G. R. de L. Efeito do BAP e AIB na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. No prelo.
- FIOLA, A. J.; SWARTZ, H. J. Somatic embriogenesis and organogenesis in-vitro from immature *Rubus* ovules. **Hortscience**, Alexandria, v. 20, n. 2, p. 184, Apr. 1985.
- FIOLA, J. A.; HASSAN, M. A.; SWARTZ, H. J.; BORS, R. H.; MCNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, n. 3, p. 223-228, 1990.
- FORTES, G. R. de L. Controle da vitrificação na cultura *in vitro* da amoreira (*Rubus* sp.) cv. Ébano, através da manipulação dos compostos nitrogenados, ágar e sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 3, p. 305-306, out. 1991.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 2v.
- GINGAS, V. M.; STOKES, B. D. *Rubus* plant regeneration via asexual embryogenesis. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 1, p. 58, 1993.
- GRAHAM, J.; IASI, L.; MILLAM, S. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 3, p. 167-173, 1997.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998, v. 1, p. 183-260.
- GUPTON, C. L. Production of non-chimeral colchipooids in *Rubus* species by tissue culture. **Euphytica**, Dordrecht, v. 44, n.1-2, p. 133-135, 1989.
- HALL, H. K.; QUAZI, M. H.; SKIRVIN, R. M. Isolation of a pure thornless loganberry by meristem tip culture. **Euphytica**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 1039-1044, 1986.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p 549-622.
- HOEPFNER, A. S.; NYBOM, H.; CARLSSON, U.; FRANZÉN, R. DNA fingerprinting useful for monitoring cell line identity in micropropagated raspberries. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 43, p. 53-57, 1993.

- HOEPFNER, A. S.; NESTBY, R. Micropropagation of two red raspberry clones: effect of medium composition on multiplication, microshoot size and rooting. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 41, n. 3, p. 285-293, 1991.
- HOEPFNER, A. S.; NESTBY, R.; NYBOM, H. Genetic deviation initiated by adventitious shoot regeneration from tissue cultured red raspberry. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 1, p. 71-79, 1996.
- JIN, W.; GU, Y.; ZHEN, S.-Z. *In vitro* propagation of *Rubus* species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 49, n. 3-4, p. 335-340, 1992.
- KARAKULLUKÇU, S.; AGAOGLU, Y. S.; ABAK, K. Effect of different auxin-cytokinin combinations on the *in vitro* propagation of raspberry cv. Schonemann. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 352, p. 127-132, 1993.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. In: CASSELLS, A. C.; JONES, P.W. **The methodology of plant genetic manipulation: criteria for decision making**. Proceedings of the Eucarpia Plant Genetic Manipulation Section Meeting held at Cork, Ireland from September 11 to September 14, 1994. Reprinted from *Euphytica* Volume 85: 1-3, 1995. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 295-303
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1991. p. 41-78.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator Society**, v. 30, p. 421-427, 1986.
- LOPEZ-MEDINA, J.; MOORE, J. N.; McNEW, R. W. A proposed model for inheritance of primocane fruiting in tetraploid erect blackberry. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, n. 2, p. 217-221, 2000.
- McNICOL, R. J.; GRAHAM, J. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 45-50, 1990.
- McNICOL R. J.; GRAHAM, J. Temperate small fruits. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. CAB International, 1992. p. 303-321. (Biotechnology in agriculture, n. 8).
- McPHEETERS, K.; SKIRVIN, R. M. Histogenic layer manipulation in chimera 'thornless evergreen' trailing blackberry. **Euphytica**, Dordrecht, v. 32, n. 2, p. 351-360, 1983.

- McPHEETERS, K. D.; SKIRVIN, R. M.; HALL, H. K. Brambles (*Rubus* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. **Crops II**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988. p.104-123. (Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.6)
- MILLÁN-MENDOZA, B. Regeneration of *Rubus in vitro* using forchlorfenuron (CPPU). **Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia**, v. 15, n. 3, p. 242-248, 1998.
- MOKHAMMED, A. I.; BUTENKO, R. G. Cultivar-specific features in raspberry clonal micropropagation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 45, n. 5, p. 692-694, 1998.
- MOORE, J. N.; BROWN, E.; SISTRUNK, W. A. 'Cherokee' blackberry. **Hortscience**, Alexandria, v. 9, n. 3, p. 246, jun, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEZI, A. N.; TREVISAN, R.; PIUMA, M. T.; FORTES, G. R. de L. **Efeito do TDZ e BAP na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Guarani**. No prelo.
- PERUZZO, E. L.; DAL BÓ, M. A.; PICCOLI, J. P. Amora-preta: variedades e propagação. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 8, n. 3, p. 53-55, 1995.
- PYOTT, J. L.; CONVERSE, R. H. *In vitro* propagation of heat-treated red raspberry clones. **Hortscience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 308-309, 1981.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de prunus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 437-442, 1977.
- RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. de L. Emprego de diferentes concentrações de ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* de amoreira preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. In: ENCONTRO ESTADUAL DE BOTÂNICOS, 10, 2000, Ijuí-RS. **Livro de Resumos**. Ijuí, 2000
- RAMIREZ DEL CASTILLO, A.; ANGARITA ZERDA, A. Estudios preliminares para la propagacion clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 7, n. 1-2, p. 17-25, 1990.
- RAMÍREZ, C.; CARRIZOSA, M. S.; RIVERA, D.; LINARES, E. Conservación de germoplasma de moras silvestres (*Rubus* spp.) de la cuenca del río el Palmar, municipio de Ubaque (Cundinamarca, Colombia). II: Conservación y manejo *ex situ*. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, n. 115, p. 13-22, 1998.
- RASEIRA, M. do C. B.; SANTOS, A. M. dos; MADAIL, J. C. M. **A cultura da amora-preta**. Brasília: Embrapa-SPI - Pelotas: Embrapa-CPACT, 1996, 52 p. (Coleção Plantar, 33).

- SCHUERMAN, P. L.; DANDEKAR, A. M. Transformation of temperate woody crops: progress and potenciales. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 55, p. 101-104, 1993.
- SILVA, A. T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J. S.; ANTUNES, L. E. C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 43-48, jan. 1995.
- SIQUEIRA, E. R. de; INQUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos de coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 949-953, jul. 1991.
- SOBCZYKIEWICZ, D. Micropropagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. **High-tech and micropropagation II**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. p 339-353. (Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 19).
- SWARTZ, H. J.; BORS, R.; MOHAMED, F.; NAEISS, K. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 179-184, 1990.
- SWARTZ, H. J. et al. Maryland/Virginia/New Jersey/Wisconsin *Rubus* breeding program. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 352, p. 485-492, 1993.
- SWARTZ, H. J.; GALLETTA, G. J.; ZIMMERMAN, R. H. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated Thornless Blackberries. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 2, p. 285-290, 1983.
- TOLEDO, J.; TORPOCO, C.; ROCA, W. Eliminación de bacterias endógenas en cultivo *in vitro* de *Ipomoea batata*. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4, 2001, Goiânia-GO. **Resumos**. Goiânia: Redbio, 2000. 205 p.
- TURK, B. A.; SWARTZ, H. J.; ZIMMERMAN, R. H. Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 11-17, 1994.
- UENO, K.; CHEPLICK, S.; SHETTY, K. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 33, n. 4, p 441-445, 1998.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Nefrut. **Amora-preta**. Disponível em: <<http://www.ufla.br/pagina/pesquisa/nefrut/amorapreta.htm>> Acesso: 18 out. 2001.
- WELANDER, M. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 60, n. 4, p. 493-499, 1985.

WILLIAMSON, B.; COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M., LEIFERT, C., BREESE, W. A.; SHATTOCK, R. C. Fungal infections of micropropagated plants at weaning: a problem exemplified by downy mildews in *Rubus* and *Rosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 1-2, p. 89-96, 1998.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 231-246

ZIMMERMAN, R. H.; BHARDWAJ, S. V.; FORDHAM, I. M. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 207-213, 1995.



## **ANEXOS**

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais para a variável contaminação .....	109
ANEXO 2 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de controle da oxidação no cultivo inicial de meristemas para a variável explantes oxidados.....	109
ANEXO 3 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (primeiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca (dados originais e dados transformados para logritmo de x), altura dos brotos e número de folhas por broto.....	110
ANEXO 4 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (segundo subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca (dados originais e dados transformados para logaritmo de x), altura dos brotos e número de folhas por broto.....	110
ANEXO 5 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (terceiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos (dados originais e dados transformados para logaritmo de x) e número de folhas por broto.....	111

ANEXO 6 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (quarto subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto .....	111
ANEXO 7 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (primeiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto .....	112
ANEXO 8 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (segundo subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto .....	112
ANEXO 9 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (terceiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto .....	113
ANEXO 10 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento <i>in vitro</i> com e sem imersão em solução 1 mM de AIB para as variáveis plântulas enraizadas, número de raízes por plântula, comprimento das raízes, altura das plântulas e número de folhas por plântula.....	113
ANEXO 11 -	Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas (primeira avaliação) para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula.....	114

ANEXO 12 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento <i>ex vitro</i> com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas (segunda avaliação) para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula.....	114
ANEXO 13 - Análise de Variância do experimento de aclimação após enraizamento <i>in vitro</i> para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula .....	115
ANEXO 14 - Laudo da análise realizada pelo Laboratório Marcos Enrietti .....	115

**ANEXO 1 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de assepsia no cultivo inicial de segmentos nodais para a variável contaminação**

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS
Tratamentos	3	617,59 **
Erro	12	91,67
Total	15	
Qui-quadrado		4,5 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 2 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de controle da oxidação no cultivo inicial de meristemas para a variável explantes oxidados**

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS
Tratamentos	2	2.173,15 **
Erro	9	113,27
Total	11	
Qui-quadrado		3,28 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 3 -** Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (primeiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca (dados originais e dados transformados para logritmo de x), altura dos brotos e número de folhas por broto

		QUADRADOS MÉDIOS		
	GRAUS DE LIBERDADE	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS ORIGINAIS)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS TRANSFORMADOS)	ALTURA DOS BROTO NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	10		0,15 **	0,44 ** 8,55 **
Erro	33		0,01	0,03 0,40
Total	43			
Qui-quadrado		34,02 **	16,53 <sup>NS</sup>	13,71 <sup>NS</sup> 11,19 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 4 -** Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (segundo subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca (dados originais e dados transformados para logaritmo de x), altura dos brotos e número de folhas por broto

		QUADRADOS MÉDIOS		
	GRAUS DE LIBERDADE	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS ORIGINAIS)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS TRANSFORMADOS)	ALTURA DOS BROTO NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	8		0,31 **	1,18 ** 13,19 **
Erro	27		0,003	0,05 0,84
Total	35			
Qui-quadrado		29,11 **	10,65 <sup>NS</sup>	8,02 <sup>NS</sup> 7,26 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 5 -** Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (terceiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos (dados originais e dados transformados para logaritmo de x) e número de folhas por broto

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS		
		NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA	ALTURA DOS BROTO (DADOS ORIGINAIS)	ALTURA DOS BROTO (DADOS TRANSFORMADOS)
Tratamentos	8	22,60 **		0,15 **
Erro	27	0,01		0,002
Total	35			
Qui-quadrado		14,68 <sup>NS</sup>	15,89 *	6,83 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

\* Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 6 -** Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando diferentes reguladores de crescimento do grupo das citocininas (quarto subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS		
		NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA	ALTURA DOS BROTO	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	8	1,18 **	4,43 **	3,85 **
Erro	27	0,01	0,05	0,24
Total	35			
Qui-quadrado		15,04 <sup>NS</sup>	13,30 <sup>NS</sup>	8,55 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 7 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (primeiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto**

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS		
		NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA	ALTURA DOS BROTO	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	4	1,53 *	0,03 **	0,43 *
Erro	15	0,32	0,005	0,09
Total	19			
Qui-quadrado		7,31 <sup>NS</sup>	6,00 <sup>NS</sup>	7,94 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

\* Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 8 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (segundo subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto**

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS		
		NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA	ALTURA DOS BROTO	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	4	5,02 **	0,11 **	1,95 **
Erro	15	0,13	0,01	0,31
Total	19			
Qui-quadrado		8,40 <sup>NS</sup>	3,94 <sup>NS</sup>	2,38 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.



**ANEXO 9 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de multiplicação testando sais minerais de diferentes meios de cultura (terceiro subcultivo) para as variáveis número de brotos por micro-estaca, altura dos brotos e número de folhas por broto**

		QUADRADOS MÉDIOS			
	GRAUS DE LIBERDADE	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS ORIGINAIS)	NÚMERO DE BROTO POR MICRO-ESTACA (DADOS TRANSFORMADOS)	ALTURA DOS BROTO	NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO
Tratamentos	4		0,04 *	0,20 **	1,08 <sup>NS</sup>
Erro	15		0,01	0,02	0,82
Total	19				
Qui-quadrado		14,29 **	9,00 <sup>NS</sup>	1,86 <sup>NS</sup>	1,62 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

\* Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

**ANEXO 10 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento *in vitro* com e sem imersão em solução 1 mM de AIB para as variáveis plântulas enraizadas, número de raízes por plântula, comprimento das raízes, altura das plântulas e número de folhas por plântula**

		QUADRADOS MÉDIOS				
	GRAUS DE LIBERDADE	PLÂNTULAS ENRAIZADAS (%)	NÚMERO DE RAÍZES POR PLÂNTULA (n°)	COMPRI-MENTO DAS RAÍZES (cm)	ALTURA DAS PLÂNTULAS (cm)	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA (n°)
Tratamentos	1	34,69 <sup>NS</sup>	4,19 *	0,13 <sup>NS</sup>	0,005 <sup>NS</sup>	0,46 <sup>NS</sup>
Erro	6	19,90	0,34	0,07	0,04	0,20
Total	7					
Qui-quadrado		0,07 <sup>NS</sup>	0,58 <sup>NS</sup>	3,05 <sup>NS</sup>	0,004 <sup>NS</sup>	1,21 <sup>NS</sup>

\* Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

ANEXO 11 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento *ex vitro* com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas (primeira avaliação) para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS	
		ALTURA DAS PLÂNTULAS	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA
Tratamentos	8	2,71 **	11,91 **
Erro	27	0,53	3,31
Total	35		
Qui-quadrado		7,71 <sup>NS</sup>	3,98 <sup>NS</sup>

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

ANEXO 12 - Análise de Variância e Teste de Bartlet do experimento de enraizamento *ex vitro* com micro-estacas provenientes do experimento da fase de multiplicação com citocininas (segunda avaliação) para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS	
		ALTURA DAS PLÂNTULAS	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA
Tratamentos	8	57,67 <sup>NS</sup>	18,74 <sup>NS</sup>
Erro	27	103,79	22,37
Total	35		
Qui-quadrado		3,57 <sup>NS</sup>	5,63 <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

ANEXO 13 - Análise de Variância do experimento de aclimação após enraizamento *in vitro* para as variáveis altura das plântulas e número de folhas por plântula

	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS	
		ALTURA DAS PLÂNTULAS	NÚMERO DE FOLHAS POR PLÂNTULA
Fator A (com ou sem sacarose)	1	1,60 **	0,20 <sup>NS</sup>
Fator B (aclimação em túnel ou em nebulização)	1	3,18 **	3,90 **
AB	1	0,23 <sup>NS</sup>	0,47 <sup>NS</sup>
Erro	12	0,07	0,23
Total	15		

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>NS</sup> Diferença não significativa.

ANEXO 14 - Laudo da análise realizada pelo Laboratório Marcos Enrietti



ESTADO DO PARANÁ  
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO  
DEPARTAMENTO DE FISCALIZAÇÃO  
CENTRO DE DIAGNÓSTICO "MARCOS ENRIETTI"  
Rua Jaime Balão 575, Campus I UFPR, Juvevê, Curitiba, Paraná  
CEP: 80040-340; Fone/Fax: (41) 352-2499; E-mail: [scabcdme@pr.gov.br](mailto:scabcdme@pr.gov.br)

## LAUDO OFICIAL

PROTOCOLO N° 3146/2001

Proprietário: Carolina Smanhoto Schuchovski Augusto

Endereço:

Município: Curitiba

CEP:

Telefone:

Remetente: Eng. Agr. Carolina S.S. Augusto

CREA/PR:

Endereço: UFPR-Fitotecnia/Lab. Micropropagação

Material Enviado: Amora-preta (*Rubus* sp.)

Espécie:

Exame: Fitopatológico

Entrada: 08/11/2001

## RESULTADO

Constatamos a presença de *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas* spp, bactérias saprofíticas favorecidas, provavelmente, pelo filme d'água e umidade no meio de cultura.

A presente análise tem seu valor restrito somente à amostra entregue no CDME

1ª VIA REMETENTE 2ª VIA DEFIS 3ª VIA LABORATÓRIO

Saída: 09/11/2001

TÉCNICO RESPONSÁVEL

ROBERTO TOMAZ  
Eng. Agr. CREA/PR 9097